

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovateli povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Monika Hrubá

Zavedení nových metod pro studium molekulárně genetické podstaty onemocnění CADASIL

Implementation of New Methods for Studying the Molecular Genetic Basis of the CADASIL
Disease

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: Mgr. Hana Vlášková

Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 28.04.2017

.....

Monika Hrubá

Poděkování:

Ráda bych poděkovala své školitelce Mgr. Haně Vláškové za vedení mé diplomové práce. Cením si času, který mi věnovala, a děkuji za cenné rady, podnětné připomínky a trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Lence Dvořákové CSc. a celému kolektivu Laboratoře DNA diagnostiky ÚDMP za možnost pracovat zde na své diplomové práci a za vytvoření přátelského pracovního prostředí a ochotu poradit. Děkuji Mgr. Martinu Řebounovi za poskytnutí dat z NGS sekvenování a Ing. Filipu Majerovi Ph.D. za konzultace v oblasti qPCR. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za podporu v průběhu celého studia.

Práce vznikla za finanční podpory MZ ČR - RVO VFN64165 a GAUK 580716.

Abstrakt:

CADASIL je autozomálně dominantně dědičné neurodegenerativní onemocnění s pozdním nástupem charakterizované poškozením malých cév, podkorovými infarkty a poškozením bílé hmoty mozku. Nejčastějšími příznaky jsou migrény s aurou, cévní mozkové příhody, zhoršení kognitivních funkcí a demence. Onemocnění je způsobeno mutacemi v genu *NOTCH3*, převážně jde o jednonukleotidové záměny měnící počet cysteinových zbytků v EGF-like repetičích proteinu Notch3. V České republice se pro analýzu molekulárně genetických příčin tohoto onemocnění užívají metody Sangerova sekvenování PCR produktů a MLPA. U některých pacientů s podezřením na CADASIL se však těmito metodami nepodařilo diagnózu potvrdit. Proto bylo cílem této práce zavést metodu analýzy transkriptu Sangerovým sekvenováním PCR produktů cDNA a metodu kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR) pro zjištění velkých delecí/duplikací. Analýzou transkriptu byla experimentálně potvrzena existence transkripční varianty X1 u zdravých kontrol a bylo prokázáno, že varianta c.1725G>A (p.T575=) má vliv na sestřih. Chybným sestřihem dochází k delecí zahrnující cysteinové zbytky, a tak může tato varianta způsobovat onemocnění CADASIL. U dalších testovaných variant nebyly nalezeny změny na úrovni transkriptu. Metoda qPCR neprokázala při použití v této práci dostatečnou robustnost a pro analýzu změn genové dávky genu *NOTCH3* bude potřeba zavést citlivější metodu.

Klíčová slova:

CADASIL, *NOTCH3*, analýza transkriptu, qPCR, MLPA, Sangerovo sekvenování

Abstract:

CADASIL is a neurodegenerative autosomal dominant hereditary disease with late onset. Main symptoms are migraines with aura, cerebral ischemic events, cognitive impairment and dementia. The disease is caused by a mutation in the *NOTCH3* gene. The major mutation type changes the number of cysteine residues in the EGF-like repeats of the Notch3 protein. In Czech Republic, currently used methods for molecular genetic analysis of the CADASIL disease are Sanger sequencing and MLPA. But there are patients with CADASIL-like symptoms who were not confirmed by these methods. Therefore, the aim of this thesis was to implement transcript analysis by Sanger sequencing of cDNA PCR products and quantitative real-time PCR (qPCR) to analyze gross deletions and duplications to clarify the molecular genetic basis of the disease. By transcript analysis, the existence of the transcript variant X1 was experimentally confirmed in control samples. Moreover, the results from transcript analysis showed that non-typical missense mutation c.1725G>A (p.T575=) which does not directly change the number of cysteine residues, can cause the CADASIL disease via missplicing and subsequent causing deletion including cysteine residues. The other tested variants did not show any changes in the transcript level. The qPCR method did not demonstrate sufficient robustness in this application and it is necessary to find more sensitive method for gene dosage analysis.

Keywords:

CADASIL, *NOTCH3*, transcript analysis, qPCR, MLPA, Sanger sequencing

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Cíle práce.....	9
3	Přehled literatury	10
3.1	Onemocnění CADASIL	10
3.1.1	Protein Notch.....	12
3.1.2	Funkce genu NOTCH3.....	13
3.1.3	Fenotyp onemocnění	14
3.1.4	Kauzální mutace	15
3.1.5	Patogeneze onemocnění	17
3.1.6	Vztah mezi genotypem a fenotypem	20
3.1.7	Diagnostika.....	21
3.1.8	Transkripční varianta X1	23
3.2	Metodika.....	24
3.2.1	Kvantitativní PCR v reálném čase	24
3.2.2	Vícenásobná amplifikace využívající sondy závislé na ligaci (multiplex ligation-dependent probe amplification).....	29
4	Materiál a metody.....	31
4.1	Soubor pacientů	31
4.2	Chemikálie a roztoky.....	33
4.3	Použité primery.....	34
4.4	Metody.....	38
4.4.1	Izolace DNA.....	38
4.4.2	Izolace celkové RNA	39
4.4.3	Reverzní transkripce.....	41
4.4.4	Polymerázová řetězová reakce	43
4.4.5	Horizontální gelová elektroforéza	43

4.4.6	Přečištění PCR produktu	44
4.4.7	Měření koncentrace DNA a RNA a ověření jejich čistoty	46
4.4.8	Kvantitativní PCR v reálném čase	47
4.4.9	Restrikční reakce	48
4.4.10	Srážení DNA ethanolem.....	52
4.4.11	Dialýza v malém objemu (Drop Dialysis).....	53
4.4.12	Sekvenování PCR produktů Sangerovou metodou	53
4.4.13	MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Amplification).....	55
5	Výsledky.....	57
5.1	Analýza transkriptu genu NOTCH3	57
5.1.1	Optimalizace analýzy transkriptu genu NOTCH3	57
5.1.2	Transkripční varianta X1 genu NOTCH3	62
5.1.3	Výsledky analýzy transkriptu genu NOTCH3 u pacientů.....	64
5.2	Potvrzení výsledků metodou NGS sekvenování	69
5.3	Výsledky metody kvantitativní PCR v reálném čase	70
5.4	Potvrzení výsledků metodou MLPA	75
6	Diskuze.....	77
7	Souhrn	86
8	Seznam použité literatury	87
Příloha 1: Grafické znázornění nasedacích míst primerů použitých pro analýzu transkriptu na sekvenci cDNA genu NOTCH3		I
Příloha 2: Minikopie posteru prezentovaného na konferenci ESHG v roce 2016		IV

Seznam zkratek:

bp	pár bazí
CADASIL	mozkové autozomálně dominantně dědičné poškození cév s podkorovými infarkty a poškozením bílé hmoty mozkové
CBS	Center for biological sequence analysis (Centrum pro analýzu biologické sekvence)
cDNA	komplementární DNA
CMP	cévní mozková příhoda
Ct	prahový cyklus
CT	počítačová tomografie
ddH ₂ O	destilovaná a demineralizovaná voda
dH ₂ O	destilovaná voda
DMSO	dimethylsulfoxid
dNTP	deoxynukleotid trifosfát
EGF	epidermální růstový faktor
ESHG	European Society of Human Genetics (Evropská společnost pro genetiku člověka)
ExAc	databáze Exome Aggregation Consortium
GOM	granulární osmiofilní materiál
HGMD	The Human Gene Mutation Database (Databáze lidských genových mutací)
LNR	Lin-12/Notch repete
MLPA	vícenásobná amplifikace využívající sondy závislé na ligaci
MRI	magnetická rezonance
mRNA	mediátorová RNA
NCBI	Národní centrum pro biotechnologické informace
NGS	sekvenování nové generace
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man (online databáze informací o mendelovských dědičných onemocnění)
PBS	fosfátový slaný pufr
PCR	polymerázová řetězová reakce
qPCR	kvantitativní PCR v reálném čase
RA	rodinná anamnéza
RE	restrikční endonukleáza
RT	reverzní transkripce
SNP	jednonukleotidový polymorfismus
TBE pufr	tris-borát-EDTA pufr
TE pufr	tris/EDTA pufr
U	jednotka
ÚDMP	Ústav dědičných metabolických poruch
UTR	nepřekládaná oblast mRNA

1 Úvod

Onemocnění CADASIL je autozomálně dominantně dědičné neurodegenerativní onemocnění. Jako u většiny ostatních autozomálně dominantně dědičných poruch se první symptomy projevují až v dospělosti. Onemocnění se vyznačuje variabilním průběhem, ale typickými příznaky jsou migrény s aurou, časté cévní mozkové příhody a následné zhoršení kognitivních funkcí. Nejčastěji je toto onemocnění způsobeno jednonukleotidovou záměnou v genu *NOTCH3*, která vede ke změně počtu cysteinových zbytků v proteinu Notch3 (Joutel and Corpechot, 1997; Joutel et al., 1997a; Opherck et al., 2004; Tournier-Lasserre, 1993). Proto, i když je léčba tohoto onemocnění zatím možná pouze symptomaticky, existuje návrh cílené léčby pomocí korekce počtu cysteinových zbytků v proteinu Notch3 metodou přeskočení exonu (Rutten et al., 2016a). Tento model léčby byl zatím vyzkoušen pouze *in vitro*. Spektrum kauzálních mutací je však větší – kromě tohoto typu mutace jsou v menší míře popsány i jiné mutace ovlivňující počet cysteinových zbytků, a to krátké inserce a delece neměnící čtecí rámec a sestřihové mutace. V daleko menším množství jsou zaznamenány i záměny neměnící počet cysteinových zbytků. Podle databáze HGMD ([online], dostupné z: <https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/all.php>, [cit. 2017-02-25]) je s onemocněním CADASIL spojeno pouze 17 kauzálních a 6 dalších pravděpodobně kauzálních jednonukleotidových záměn neměnící počet cysteinových zbytků z celkových 259 mutací typu nonsense/missense.

Laboratoř DNA diagnostiky Ústavu dědičných metabolických poruch v Praze, kde byla tato diplomová práce vypracována, je jedinou laboratoří v České republice, která nabízí genetické vyšetření genu *NOTCH3* za účelem diagnostiky onemocnění CADASIL. K únoru 2017 zde byla tato diagnóza potvrzena metodou Sangerova sekvenování u 41 pacientů z celkového počtu 268 suspektních pacientů. Zbývá tedy velký počet pacientů, u kterých nebyla touto metodou nalezena kauzální mutace. U 12 pacientů bylo nalezeno celkem 7 různých jednonukleotidových záměn s nejasnou patogenitou, které nemění počet cysteinových zbytků na úrovni genomové DNA. Vliv takových variant na transkript a vznikající protein nebyl znám.

Heterogenita nalezených variant a nejasná patogenita je problémem současné diagnostiky i studia onemocnění CADASIL. Zavedení nových metod by mělo přispět k přesnější diagnostice, k objasnění podstaty onemocnění a jeho variabilní expresivity. Cílem této diplomové práce je zavést metodu analýzy transkriptu pro objasnění, jaký mají nové netypické varianty vliv na stabilitu transkriptu a jeho sestřih, a metodu kvantitativní PCR v reálném čase pro zjištění velkých delecí a duplikací genu *NOTCH3*, které by mohly vést k onemocnění CADASIL.

2 Cíle práce

- Zavedení metod pro studium molekulárně genetické podstaty onemocnění CADASIL. Jedná se o metody:
 - sekvenování PCR produktů cDNA Sangerovou metodou pro analýzu transkriptu
 - metoda kvantitativní PCR v reálném čase pro analýzu rozsáhlých delecí a duplikací genu *NOTCH3*

3 Přehled literatury

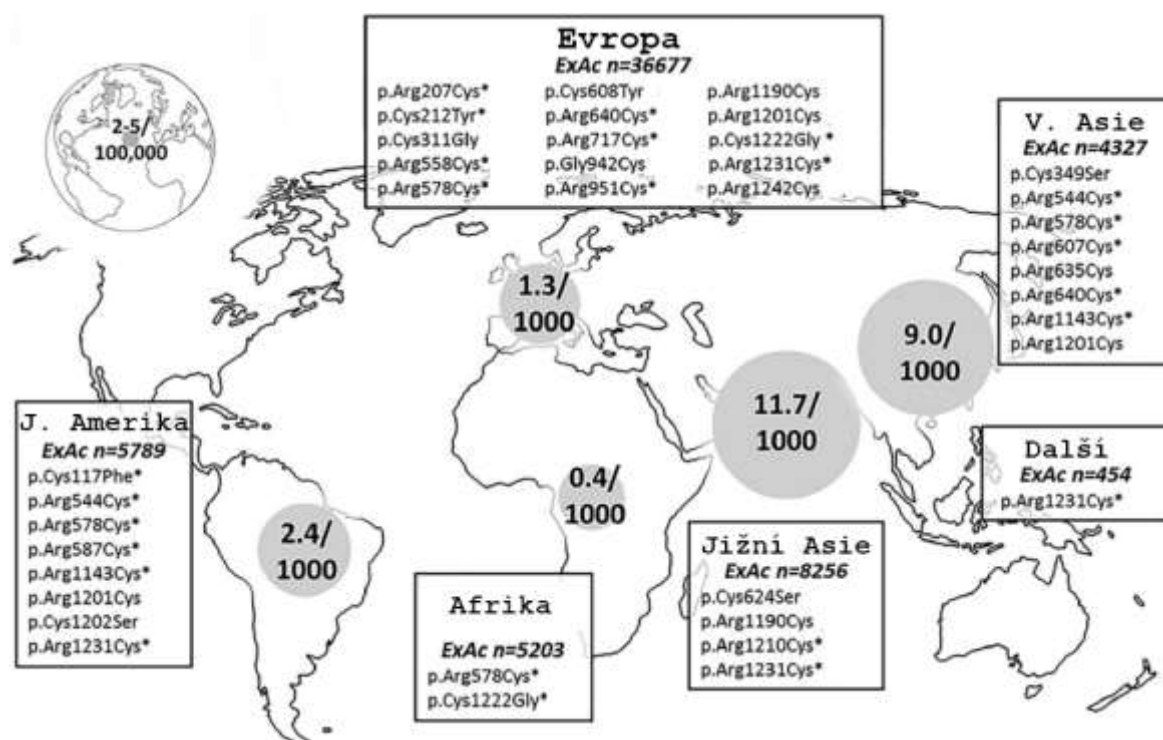
3.1 Onemocnění CADASIL

Onemocnění CADASIL (Cerebral Autosomal Dominant Arthetopathy with Subcortical Infarcts and Leucoencephalopathy) je autozomálně dominantně dědičným onemocněním, jehož hlavní projevy, jež jsou uvedeny i v celém anglickém názvu onemocnění, jsou poškození mozkových cév s následnými podkorovými infarkty a poškozením bílé hmoty mozku (Joutel et al., 1997a; Tournier-Lasserre et al., 1993). Toto onemocnění je zapříčiněno mutacemi v genu *NOTCH3*, který leží na krátkém raménku chromozomu 19.

Mutace v genu *NOTCH3* jsou asociovány se třemi onemocněními, liší se však svojí pozicí. Onemocnění CADASIL (OMIM: 125310) způsobují mutace v extracelulární doméně proteinu, dětskou myofibromatózu 2 (OMIM: 615293) způsobuje jediná popsána mutace v distální části extracelulární domény a Lehmanův syndrom (OMIM: 130720) způsobují mutace v intracelulární doméně. Všechny tři onemocnění jsou autozomálně dominantně dědičné.

První výzkumy zjišťující prevalenci onemocnění CADASIL proběhly v západním Skotsku. Výsledkem byla prevalence 1,98 nemocných na 100 000 dospělých (Razvi, 2005). O devět let později ve stejné oblasti byla navazujícím výzkumem zvýšena prevalence na minimálně 4,6 na 100 000 dospělých až 10,7 na 10 000 (Moreton et al., 2014). Tento vývoj mohl být způsoben tím, že v této oblasti došlo ke zvýšení povědomí o tomto onemocnění, zlepšení diagnostických metod i k častějšímu využívání magnetické rezonance. Bylo zjištěno, že oproti dřívějšímu očekávání se onemocnění CADASIL může začít projevovat až ve vyšším věku a projevy mohou být mírnější, než se dosud předpokládalo. Určit prevalenci celosvětově bylo cílem výzkumu další vědecké skupiny (Rutten et al., 2016b). Bylo provedeno vyhledávání typických mutací pro onemocnění CADASIL ve veřejně přístupné databázi Exome Aggregation Consortium, která v současnosti obsahuje exomová data 60 706 nepříbuzných lidí různých národností. Jako typická patogenní mutace byla hledána jednonukleotidová záměna, která způsobuje změnu počtu cysteinových zbytků v jedné z 34 repetice podobných epidermálnímu růstovému faktoru (EGF-like repetice) proteinu Notch3. Tímto způsobem byla určena prevalence 3,4 na 1 000 dospělých (Obr. 1). Více než polovina takto nalezených mutací byla již dříve popsána u pacientů s onemocněním CADASIL. Takovou změnu v prevalenci oproti dřívějším udávaným datům je podle autorů možné vysvětlit více způsoby: (a) určitá část zjištěných mutací není patogenní, ale je to pouze polymorfismus, (b) u lidí s těmito mutacemi nebylo zatím onemocnění CADASIL

diagnostikováno, ačkoliv mutace jsou opravdu patogenní, (c) některé mutace mohou mít sníženou penetranci, například v různých populacích, (d) některé mutace způsobují onemocnění CADASIL s pozdním nástupem a slabšími projevy. Jelikož se distribuce nalezených mutací liší od distribuce mutací v holandském i v celosvětovém registru mutací způsobujících onemocnění CADASIL, především možnosti a, c, d jsou velmi pravděpodobné.

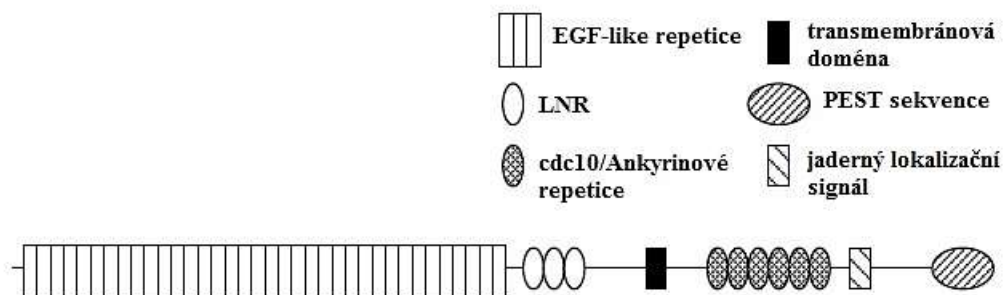


Obr. 1. Frekvence onemocnění CADASIL ve světě a v různých populacích odvozená z frekvence mutací měnící počet cysteinových zbytků v EGF-like repetičích genu *NOTCH3* z databáze Exome Aggregation Consortium (ExAc). Původně udávaná celosvětová prevalence byla 2-5 na 100 000 dospělých. Nově popsané prevalence i nalezené mutace jsou popsány u jednotlivých populací. Písmenem n je označené množství otestovaných exomů a * u jednotlivých mutací značí ty mutace, které již byly popsány v souvislosti s onemocněním CADASIL. Upraveno podle (Rutten et al., 2016b).

Podle dat Laboratoře DNA diagnostiky Ústavu dědičných metabolických poruch, která se jako jediná v České republice zabývá diagnostikou onemocnění CADASIL, bylo dosud v České republice diagnostikováno 41 probandů s onemocněním CADASIL. I s vyšetřenými příbuznými je v databázi 83 pacientů.

3.1.1 Protein Notch

Proteiny z rodiny Notch jsou transmembránové proteiny stejně jako jejich ligandy z rodiny Delta a Serrate (u savců nazvána Jagged) (shrnutí v Bray, 2006; Weinmaster, Roberts, & Lemke, 1991). Protein Notch má mnoho vysoce konzervovaných motivů (Obr. 2). V intracelulární doméně je nejkonzervovanějších 6 cdc10/Ankyrinových repetice a 77 C-koncových aminokyselin, které jsou složeny z několika serinových a threoninových zbytků, které jsou obklopeny proliny a které tvoří potenciální místa pro fosforylace. V intracelulární doméně se dále nachází jaderný lokalizační signál a PEST sekvence, která je bohatá na aminokyselinové zbytky prolinu, glutamové kyseliny, serinu a threoninu a účastní se degradace proteinu Notch. Extracelulárně se nachází repetice podobné epidermálnímu růstovému faktoru (EGF-like repetice) bohaté na cysteinové zbytky. Tyto repetice jsou důležité pro vazbu ligandu. Vysoce konzervovaný je i počet a pozice tří domén bohatých na cysteiny lin-12/Notch repetice (LNR).



Obr. 2. Konzervované struktury proteinů z rodiny Notch. Extracelulární a intracelulární doménu odděluje transmembránová doména. Intracelulární doména obsahuje 6 cdc10/Ankyrinových repetice, jaderný lokalizační signál a PEST sekvenci. Extracelulární doména obsahuje EGF-like repetice a lin-12/Notch repetice (LNR). Upraveno podle (Nye et al., 1994).

Před vystavením receptoru na povrch buňky dochází v trans-Golgi aparátu k prvnímu proteolytickému štěpení katalyzovanému enzymem Furin, které vytváří z proteinu heterodimer sestavený z extracelulární domény a transmembránové - intracelulární domény (shrnutí v Guruharsha, Kankel, & Artavanis-Tsakonas, 2012). Tyto dvě části spolu interagují nekovalentními vazbami. Navázání ligandu na receptor Notch na povrchu buňky iniciuje další dvě proteolytická štěpení. První je katalyzováno rodinou metaloproteáz Adam, druhé enzymem γ -sekretáza. Druhé štěpení uvolní intracelulární doménu receptoru, která putuje do buněčného jádra, kde vazbou na DNA-vazebné proteiny ovlivňuje transkripci. U savců jsou popsány čtyři receptory Notch, u *Caenorhabditis elegans* dva, u *Drosophila melanogaster* jeden. Receptory rodiny Notch hrají důležitou roli během vývoje mnoha tkání. (shrnutí v Bray, 2006)

3.1.2 Funkce genu *NOTCH3*

K výzkumu funkce genu *Notch3* u obratlovců byly využity modelové organismy dánío pruhované (*Danio rerio*) a hlodavci - myš domácí (*Mus musculus*) a potkan laboratorní (*Rattus norvegicus*). Ve všech těchto organismech má gen *Notch3* funkci při vývoji cév – účastní se tepno-žilní diferenciaci (Domenga et al., 2004; Lawson et al., 2001). Exprese genu *Notch3* u myši (*Mus musculus*) stejně jako u lidí je zahájena během embryogeneze, kdy dochází k diferenciaci cév (Domenga et al., 2004; Ichinohe et al., 2004; Prakash et al., 2002). Během embryogeneze dává vzniknout karotidám a dalším velkým tepnám. Postnatálně, kdy dochází k maturaci cév, probíhá exprese genu *Notch3* v malých a středně velkých tepnách a je s nimi asociována až do dospělosti. K expresi genu nedochází v tepénkách, vlásečnicích ani v žilách.

Po delecí genu *Notch3* zůstávají velké tepny (např. krkavice) beze změny oproti kontrolám divokého typu, ale malé a středně velké tepny (u myši ocasní a střední mozkové tepny) vykazují velká poškození (Domenga et al., 2004; Lawson et al., 2001). Střední vrstva cévní stěny (tunica media) byla zúžená a neuspořádaná a vrstva elastinu (elastica lamina interna) byla také zúžená. Buňky hladké svaloviny cév se vyskytovaly ve stejném množství jako u kontrol, ale byly tenčí, tvořily výrůstky a seskupovaly se do shluků. Endotelové buňky poškozených tepen byly v pořádku. Takto mutované tepny strukturně připomínají spíše žíly.

Svalové napětí, neboli myogenní tonus, je vlastností buněk hladké svaloviny tepen. Do svalového napětí se zapojuje protein pMLC, jehož exprese je u myši s deletovaným genem *Notch3* snížena (Chantemèle, 2008). Poškozené tepny pak mají snížené svalové napětí a při průtoku krve jsou více dilatované. Delecí genu *Notch3* tedy nedochází jen ke strukturním změnám, ale poškozené tepny ztrácí i své funkční vlastnosti.

Exprese genu *Notch3* také ovlivňuje RhoA/Rho kinázovou dráhu (Chantemèle, 2008). Ta hraje klíčovou roli v citlivosti kontraktilního tepenného aparátu v odpovědi na vazokonstrikci, což jsou látky vedoucí ke stažení cév. Delece genu *Notch3* vedla ke snížení aktivity proteinu RhoA, ačkoliv množství tohoto proteinu zůstalo stejné.

Vliv exprese lidského genu *NOTCH3* na vývoj buněk hladké svaloviny cév byl potvrzen pokusy na *in vitro* systému, kde buňky hladké svaloviny cév byly odvozeny od lidských embryonálních kmenových buněk (Granata et al., 2015).

U dánia bylo navíc zjištěno, že exprese genu *Notch3* je detekovatelná také v mozkových pericytech (Wang et al., 2014). Pericyty jsou buňky obalující vlasečnice a v mozku hrají důležitou roli v udržení hematoencefalické bariéry. Exprese genu *Notch3* pozitivně ovlivňuje proliferaci pericytů.

Kromě funkce genu *Notch3* v cévní soustavě, bylo provedeno několik pokusů, jejichž výsledky ukazují, že gen *Notch3* hraje roli i ve vývoji neuronů. U dánia se tento gen podílí na embryonálním vývoji prekurzorových buněk oligodendrocytů (Zaucker et al., 2013). Oligodendrocyty jsou následně potřeba k zajištění exprese myelinu v zadním mozku. U hlo-davců je gen *Notch3* exprimován během diferenciaci a maturace neuronů v dospělosti, během embryonálního vývoje to zatím není jasné (Rusanescu and Mao, 2014). Naopak z lidských moz-kových tkání bylo zjištěno, že gen *NOTCH3* je exprimován v nezralých neuronech a gliových buňkách v brzkém fetálním vývoji a tato exprese byla identifikovatelná pouze do porodu (Ichinohe et al., 2004). Přesná funkce genu *Notch3* ve vývoji nervové soustavy však není dosud známá.

Zvýšená exprese genu *NOTCH3* byla zjištěna u několika druhů rakovinného bujení – například u hepatocelulárního karcinomu (Hu et al., 2013), kolorektálního karcinomu (Serafin et al., 2011), rakoviny prsu (Yamaguchi et al., 2008) a plicního karcinomu (Haruki et al., 2005). Míra exprese genu většinou korelovala se závažností projevu rakoviny.

3.1.3 Fenotyp onemocnění

Onemocnění CADASIL se typicky začíná projevovat ve střední dospělosti migrénami nebo ischemickými příhodami (van den Boom et al., 2003; Desmond et al., 1999; Dichgans et al., 1998; Opherk et al., 2004; Peters et al., 2004a; Rutten et al., 2013; Tan and Markus, 2016). Migrénami trpí většina pacientů, nejčastěji dochází k migrénám s aurou. Pokud se jako první projevují migrény, je věk prvních projevů nižší, okolo 30 let. Pokud jsou však první symptomy ischemické příhody, jejich počátek je přibližně okolo 40 let i déle. Ještě před těmito prvními subjektivně rozpoznatelnými příznaky, přibližně mezi 20 až 30 lety, dochází ke vznikům lézí v bílé hmotě mozkové, které je možné sledovat na magnetické rezonanci (MRI). V době prv-ních projevů onemocnění je na MRI možné vidět menší cévní mozkové příhody. Další postřeh-nutelné změny lze nalézt v oblastech mozku, jako jsou capsula externa, bazální ganglia a moz-kový kmen. Později se začínají objevovat lakunární infarkty, což jsou cévní mozkové příhody s postižením motorického či senzorického centra, a opakující se podkorové ischemické příhody, které mohou vést k následné demenci a dalším kognitivním deficitům se změnami v předním

laloku mozku. Vyskytují se i příznaky jako inkontinence, potíže s polykáním a často pouze přechodně patologický smích a pláč. Na magnetické rezonanci jsou vidět četné stopy po mikrovřácení. Progrese onemocnění se u pacientů různí, někteří zůstávají dlouho ve stabilizovaném stavu, jiní vykazují rychlé zhoršení. Většina pacientů je v době smrti již uvázána na lůžko a odkázána na péči. Zápal plic je nejčastější příčinou smrti. Ačkoliv délka života se mezi pacienty různí, zpravidla dochází k jejímu snížení oproti průměru.

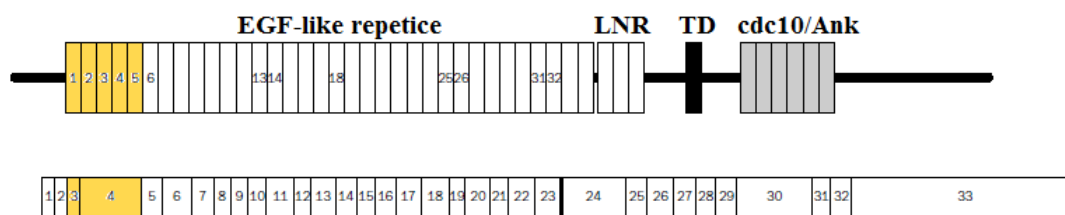
Projevy onemocnění se liší i podle pohlaví pacientů (Dichgans et al., 1998; Gunda et al., 2012; Opherk et al., 2004). U žen ve věku před menopauzou se častěji vyskytují migrény s aurou oproti mužům, ale četnost ischemických příhod je u nich naopak menší. Po menopauze se tyto rozdíly stírají. Muži vykazují častěji apatii a objevuje se u nich vyšší stupeň mozkové atrofie zapříčiněné podkorovými ischemickými příhodami. V pokročilejších fázích onemocnění muži vykazují menší soběstačnost a výkonnost než ženy. Dříve se stávají imobilizovaní a dříve umírají. Tyto rozdíly mezi pohlavími autoři dávají do souvislosti s pohlavními hormony.

Rozdíl v závažnosti onemocnění byl popsán i u jednovaječných dvojčat (Mykkänen et al., 2009). První projev cévní mozkové příhody u jednoho dvojčete byl zaznamenán o 14 let dříve než u druhého. Také další projevy a nálezy na MRI byly u tohoto dvojčete horší. Dvojčata se však lišila tím, že dvojče s pozdějšími projevy nikdy nekouřilo a od mládí aktivně sportovalo. Naopak druhé dvojče kouřilo cigarety denně a cvičilo méně. Kuřáctví bylo navrženo jako rizikový faktor i v další studii (Singhal et al., 2004). Byla pozorována souvislost s kouřením a věkem nástupu ischemických příhod. Zvýšené množství homocysteinu bylo asociováno s migrénami, ale ne s ischemickými poruchami.

CADASIL je také spojen s kratšími konci telomer chromozomů (Ragno et al., 2011). Bylo zjištěno, že pacienti s nižší soběstačností měli kratší telomery než ostatní. Tyto výsledky jsou podle autorů výsledkem působení vyšších hladin oxidativního stresu a chronického zánětu.

3.1.4 Kauzální mutace

Lidský gen *NOTCH3* obsahuje 33 exonů. Prvních 23 exonů kóduje extracelulární část proteinu obsahující všech 34 EGF-like repetice (Obr. 3) (Joutel et al., 1997b, 2001). Nejčastější mutace, často označována jako typická mutace, je jednonukleotidová změna měnící počet cysteinových zbytků v EGF-like repeticích proteinu Notch3. Ve studiích provedených s velkými soubory pacientů bylo zjištěno, že mutace se vyskytují obvykle v oblasti 5' konce genu a více než polovina pacientů nese mutace v exonu 3 nebo 4 (Joutel et al., 1996, 1997b; Liu et al., 2015; Peters and Opherk, 2005). Tyto exony obsahují EGF-like repetice 1-5.



Obr. 3. Nahoře znázorněný protein Notch3 s konzervovanými doménami (EGF-like repetitive, LNR, TD – transmembránová doména, cdc10/Ankyrinové repetitive), dole znázorněné exony genu *NOTCH3* včetně poměrných délek jednotlivých exonů. Exony 3 a 4 kódují prvních pět EGF-like repetice. Prvních 23 exonů kóduje všech 34 EGF-like repetice. Upraveno podle (Joutel et al., 1997b).

Autoři několika dalších studií ale oponují shlukování mutací do prvních EGF-like repetice. V Itálii při vyšetření 28 rodin bylo největší množství mutací nalezeno v exonu 11, poté až v exonu 4 (Dotti et al., 2005). Zajímavostí bylo, že rozložení mutací se lišilo podle geografického původu rodin. Mutace rovnoměrně rozložené v exonech 4, 6, 9, 11, 16, 18 a 20 byly nalezeny pomocí sekvenování nové generace (Maksemous et al., 2016).

Kromě výše popsaných typů mutací byly ve větším počtu již zaznamenány i nesynonymní záměny neměnicí počet cysteinových zbytků a synonymní záměny v EGF-like repetičích a malé delece i inzerce neměnicí čtecí rámec, které ale mění počet cysteinových zbytků v EGF-like repetičích (Dichgans et al., 2000; Maksemous et al., 2016; Peters and Opherck, 2005). Jako kauzální mutace byla vyhodnocena i intronová delece 3 nukleotidů, která měnila sestřih mRNA tak že v transkriptu zůstal nevystřižen celý intron 3 (Bianchi et al., 2013). V proteinu tak bylo vloženo bez změny čtecího rámce o 25 aminokyselinových zbytků více včetně jednoho cysteinového.

Dále byl potvrzen i vznik mutace *de novo*, kdy biologičtí rodiče probanda danou mutaci nenesli (Joutel, 2000). Tento poznatek je důležitý pro diagnostiku. Vyplývá z něj, že je důležité i přes negativní rodinnou anamnézu uvažovat o možnosti onemocnění CADASIL.

Jsou ale také varianty, u kterých je těžké určit, zda jsou opravdu kauzální pro onemocnění CADASIL. Popsány byly například varianty způsobující zkrácení výsledného proteinu (Rutten et al., 2013). Šlo o nonsense mutaci v exonu 3 a velkou delecí exonů 3-16 s posunem čtecího rámce a vytvořením stop-kodónu v exonu 17. U obou těchto variant došlo k výraznému zkrácení proteinu, chyběla mu jak transmembránová, tak intracelulární doména. Pacienti však nevykazovali klasické příznaky, neměli abnormality v kožní biopsii ani nálezy na MRI mozku. Autoři vyhodnotili tyto hypomorfní alely jako varianty, které nezpůsobují onemocnění CADASIL.

K ověření patogenity nově objevených atypických variant provedli jiní autoři analýzu *in silico* programy předvídající patogenní funkci varianty (Maksemous et al., 2016). Variantu určili za patogenní, pokud výsledky ukazovaly na tvorbu nového sestřihového místa, které by mohlo vést ke změně funkce proteinu.

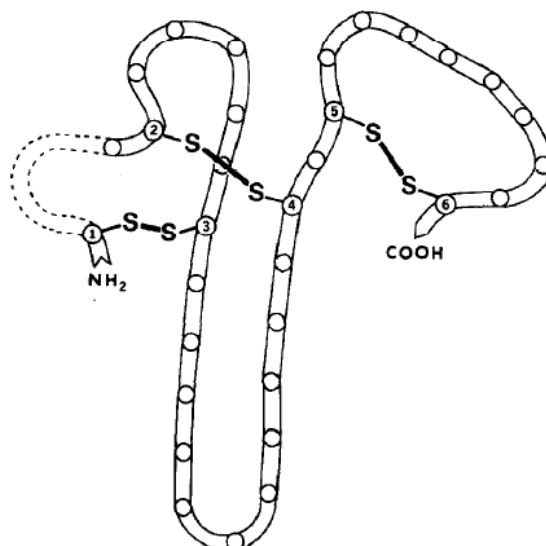
Přehled všech popsaných typů mutací v genu *NOTCH3* podle databáze HGMD ([online], dostupné z: <https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/all.php>, [cit. 2017-02-25]) je uveden v Tab. 1. Množství popsaných jednonukleotidových záměn výrazně převyšuje počet ostatních typů mutací. Většina z popsaných mutací způsobuje onemocnění CADASIL, určitá část však způsobuje poškození bílé hmoty mozkové nebo postižení kognitivních funkcí, ale zda se jedná opravdu o onemocnění CADASIL s například slabším průběhem není zatím objasněné. Malé množství mutací způsobuje jiné onemocnění jako například dětskou myofibromatózu a Lehmanův syndrom či jsou asociovány s autismem či se vznikem onkogenního onemocnění.

Tab.1. Rozdělení mutací v genu *NOTCH3* podle databáze HGMD (<https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/all.php>).

Mutace v genu <i>NOTCH3</i>	Celkový počet	Kauzální pro CADASIL	Není jisté (poškození bílé hmoty mozkové, postižení kognitivních funkcí)	Kauzální pro jiné onemocnění
jednonukleotidová záměna	293 (243 zahrnuje Cys)	262	20	11
sestřihová mutace	2	2	0	0
malá delece	8	7	1	0
malá inserce	4	3	0	1
malá inserce + delece	2	2	0	0
velká delece	4	2	0	2
velká inserce	0	0	0	0
Celkem	313	278	21	14

3.1.5 Patogeneze onemocnění

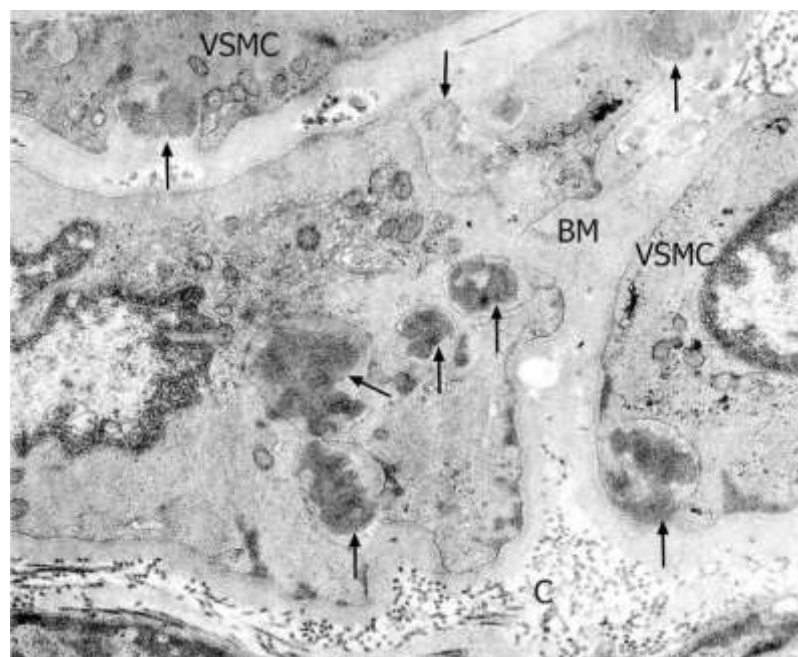
Mechanismus patogenese mutací způsobujících onemocnění CADASIL není znám. Existuje však několik hypotéz. Jelikož většina mutací mění počet cysteinových zbytků, je možné, že narušením disulfidických můstků dochází ke špatnému sbalování jednotlivých domén proteinu (Dichgans et al., 2000) (Obr. 4).



Obr. 4.: Předpokládaná struktura EGF-like domény. Prázdná kolečka znázorňují aminokyselinové zbytky, kolečka s čísly důležité cysteinové zbytky účastnící se disulfidických můstků důležitých pro sbalování proteinu do terciální struktury. Smyčka mezi Cys1 a Cys2 je variabilní v délce. Upraveno podle (Appella et al., 1988).

Podle srovnání homozygotů a heterozygotů pro danou mutaci by ale mohla být patogeneze způsobena získáním nové funkce proteinu (Monet et al., 2007; Soong et al., 2013). Jelikož hladina signalizace je nejspíše zachována, je možné, že mutovaný protein kromě původní signalizace vykazuje i jinou signalizaci nezávislou na faktorech interagujících s uvolněnou intracelulární doménou.

Další možností odvozenou z fenotypu homozygota a heterozygota pro kauzální mutaci je toxický efekt akumulace proteinu na povrchu buňky. U homozygota bylo nalezeno více ložisek granulárního osmiofilního materiálu (GOM) než u heterozygota (Liem et al., 2008). Výskyt shluků GOM na vnějším povrchu a v těsné blízkosti buněk hladké svaloviny malých tepen a na povrchu pericytů v hluboké vrstvě škáry je typický pro pacienty s onemocněním CADASIL (Baudrimont et al., 1993; Lewandowska et al., 2011). Tento materiál se dá pozorovat elektronovou mikroskopií a tvoří shluky slabě elektron-denzních granulí s průměrem 200 – 800 μm (Obr. 5). Shluky i samotné granule se liší jak velikostí, tak tvarem i osmiofilní hustotou. Podle jedné studie jsou tyto shluky tvořené extracelulární doménou receptoru Notch3 (Ishiko et al., 2006). Naopak podle jiné studie jsou shluky extracelulární domény pouze v těsné blízkosti shluků GOM (Joutel et al., 2000).



Obr. 5. Snímek z elektronové mikroskopie vzorku z biopsie kůže pacienta s onemocněním CADASIL. Na obrázku jsou šipkou označené shluky granulárního osmiofilního materiálu v blízkosti buněk hladké svaloviny malých tepen (VSMC). BM – bazální membrána, C – kolagenová vlákna. Zvětšení 7000×. Převzato z (Lewandowska et al., 2011).

Může docházet k chybnému odstraňování receptoru Notch3 z povrchu buňky, a tím k akumulaci extracelulárních domén na cytoplazmatické membráně buněk hladké svaloviny cév a pericytů (Joutel et al., 2001). Mutace způsobující onemocnění CADASIL signifikantně zvyšují multimerizaci extracelulárních domén receptoru v uspořádanější multimerní komplexu (Monet-Leprêtre et al., 2013; Opher et al., 2009).

Při zkoumání typické mutace v EGF-like repetici 3 bylo zjištěno, že dochází k poklesu množství funkčního receptoru vystaveného na povrchu buňky oproti proteinu bez mutace, na ligand ale odpovídají stejně (Karlström et al., 2002). V mutovaných buňkách se tvoří více agregátů GOM. Toto zjištění odpovídá autozomálně dominantní dědičnosti a negativnímu vlivu mutovaného proteinu vznikajícího z jedné alely. Důvodem menšího počtu proteinu na povrchu buňky může být snížené množství sestřiženého proteinu po prvním proteolytickém štěpení.

Proteiny mutované v EGF-like repeticích 10-11 ztrácí schopnost vázat ligand a v buňce se vyskytuje větší množství nesestřiženého proteinu než S1 sestřiženého (Peters et al., 2004b).

Další hypotézou, jak mutace způsobují onemocnění CADASIL, je ta, že mutace v genu *NOTCH3* vytváří predispozici ke vzniku mutací v mitochondriální DNA, mimo jiné v genu *MTA* (Annunen-Rasila et al., 2006; Malandrini et al., 2002). Ve srovnání se zdravými kontro-

lami bylo zjištěno, že pacienti s onemocněním CADASIL jsou nositelé většího množství polymorfismů v mitochondriální DNA. U pacientů byly také nalezeny abnormality v počtu i struktuře mitochondrií a poškození jejich funkce (Dotti et al., 2004; Viitanen et al., 2013). Defekt v oxidativní fosforylaci může být mechanismem patogeneze (de la Peña et al., 2001).

3.1.6 Vztah mezi genotypem a fenotypem

Vzhledem k vysoké variabilitě projevů onemocnění CADASIL je tématem výzkumů také vztah mezi určitou mutací a fenotypem onemocnění. Ve výsledcích se ale studie rozcházejí, jak je popsáno dále.

Asociace mezi genotypem a fenotypem nebyla nalezena při testování 17 různých mutací z různých exonů (Singhal et al., 2004). Nebyl nalezen ani rozdíl mezi mutacemi v exonech 2-6 a ostatními (Liu et al., 2015). Rozdíl také nebyl popsán při porovnávání mutací v různých EGF-like repeticích a cdc10/Ankyrinových repeticích (Joutel et al., 1996).

Naopak rozdíl v poloze mutace byl ukázán v další studii (Rutten et al., 2016b). Tam bylo dokázáno, že pacienti s mutacemi v EGF-like repeticích 1-6 mají signifikantně vyšší množství nalezených lézí a lakunárních infarktů v bílé hmotě mozku než pacienti s mutacemi v jiných EGF-like repeticích. Slabší projevy u mutací ve vzdálenějších EGF-like repeticích potvrzují i další práce. Byl popsán pacient s mutací v EGF-like repetici 14 (Liem et al., 2008), další pacienti s mutací v EGF-like repetici 17 (Pradotto et al., 2012), 29 (Pescini et al., 2008) i 33 (Valenti et al., 2011) a u všech těchto pacientů bylo onemocnění projevováno atypicky slabšími projevy. V holandském registru pacientů byli 4 pacienti starší sedmdesáti let, kteří nesou mutace měnící počet cysteinových zbytků v EGF-like repeticích 10 a 11 (Rutten et al., 2016b). Ti měli na MRI mozku viditelné poškození bílé hmoty odpovídající tomu, které se objevuje v počátcích onemocnění CADASIL.

Mutace v EGF-like repeticích 10-11 by mohly způsobovat rozdíl oproti ostatním, protože tyto repetice jsou důležité pro vazbu ligandu a mutace v nich mění receptor v nefunkční komplex (Peters et al., 2004b). Podle této studie pak mají nositelé těchto mutací menší počet lakunárních infarktů, ačkoliv ostatní poškození bílé hmoty je rozsáhlejší. U pacientů zůstávají velmi dlouho zachované kognitivní schopnosti.

Variabilita projevů však byla zjištěna v rámci jedné rodiny se stejnou mutací. Lišila se jak závažnost projevů, tak množství GOM (Wilder-Smith et al., 2004). Tyto dvě charakteristiky navíc podle autorů spolu korelují. Některé typické mutace (např. p.C117F a p.C174Y) jsou asociovány s kratší dobou přežití (Opherke et al., 2004). V rámci dvou rodin se stejnou mutací

p.R110C byl nalezen rozdíl v průběhu i ve věku nástupu onemocnění mezi rodinami (Uyguner et al., 2006).

I studie zaměřené na porovnání homozygotů a heterozygotů pro stejnou mutaci se liší. V jedné je průběh onemocnění skoro identický (Liem et al., 2008), v druhé a třetí je průběh u homozygota spíše horší (Soong et al., 2013; Tuominen et al., 2001). Ačkoliv to jsou tři různé rodiny s různými mutacemi, poloha mutací je podobná a odpovídá vzdálenějším EGF-like repetitím.

Porovnání fenotypu pacientů nesoucích záměnu měnící počet cysteinových zbytků s pacienty se záměnou neměnicí jejich počet je obtížné, jelikož množství takových pacientů je relativně nízké. Protože jsou takoví pacienti ve studiích srovnávajících fenotyp zastoupeni jen minoritně, není možné dosáhnout signifikantního výsledku. Zdá se však, že tento typ mutací žádné výrazné rozdíly nezpůsobuje (Liu et al., 2015; Wollenweber et al., 2015).

Cysteinová záměna na C-konci extracelulární domény, tedy až za EGF-like repetitemi, vede k neobvyklému fenotypu bez GOM (Fouillade et al., 2008). Mutace se nachází v oblasti heterodimerizace. Jejím vlivem dochází nejspíš k destabilizaci heterodimeru, a tím tato mutace aktivuje Notch3 signální dráhu bez potřeby ligandu.

Dále jsou popsány polymorfismy, které jsou asociovány s vyšší pravděpodobností vzniku cévních mozkových příhod (Yuan and Dong, 2016; Zhu et al., 2016). Jejich přítomnost v genomu pacienta může ovlivňovat variabilitu ve fenotypu.

3.1.7 Diagnostika

Diagnostiku onemocnění CADASIL lze rozdělit na klinickou a laboratorní část. Klinická část většinou zahrnuje posouzení osobní a rodinné anamnézy a vyšetření magnetickou rezonancí, výpočetní tomografií nebo pozitronovou emisní tomografií (Bianchi et al., 2013; Chabriat et al., 1995; Markus et al., 2002; Tournier-Lasserre et al., 1993; Tuominen et al., 2001).

Laboratorní část obvykle začíná genetickým vyšetřením, které se v současné době provádí především namnožením úseků odpovídající daným exonům a jejich následnou sekvenací Sangerovou metodou. V několika studiích navrhuje jako první krok genetické analýzy sekvenování pouze oblasti s nejčastějším výskytem mutací, tedy exony 3 a 4 (Joutel et al., 1997b). Jako druhý krok lze sekvenovat zbylé exony kódující EGF-like repetice proteinu. Je nutné myslet na to, že v rámci populací se nejčastější místa výskytu mutací liší, proto je potřeba určit

první vybrané exony podle dané populace (Peters and Opherck, 2005). Zaváděno je i sekvenování nové generace pro diagnostiku onemocnění CADASIL. Tato metoda vyšetření je vhodnější, pokud je potřeba sekvenovat všechny exony genu *NOTCH3*, obzvláště v populacích s mnoha etniky, u nichž se liší oblast nejčastějšího výskytu mutací (Maksemous et al., 2016). Genetické vyšetření může být spojeno s falešně negativními výsledky, proto při velmi vysokém podezření na onemocnění CADASIL a negativním výsledku z genetického vyšetření, by mělo být pacientovi doporučeno provedení biopsie kůže (Markus et al., 2002; Peters and Opherck, 2005). Z genetické části je důležité ještě zmínit, že byla provedena jak preimplantační (Konialis et al., 2007), tak prenatalní genetická diagnostika (Milunsky et al., 2005). Pro zjištění velkých delecí či inzercí je možné využít vyšetření MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification) popsané v kapitole 3.2.2. Je možné použít jak vlastní, tak komerční sadu. Vlastní sadu využili v jedné studii pro zjištění delece exonů 3-16 (Rutten et al., 2013), komerční sada je dodávána firmou MRC-Holland s názvem SALSA MLPA probemix P071-A1 Leukodystrophy- LMNB1, PLP1, NOTCH3. Problémem této sady je, že obsahuje sondy pouze pro exony 2, 7, 22 a 28 genu *NOTCH3*.

Další využívané laboratorní vyšetření je elektronová mikroskopie vzorku z biopsie kůže, při kterém se hledají depozita granulárního osmiofilního materiálu (GOM) a strukturní abnormality cév, hlavně malých a středně velkých tepen (Furby et al., 1998; Ishida et al., 2006; Kanitakis et al., 2002; Liu et al., 2015; Peters and Opherck, 2005; Tuominen et al., 2001). Přítomnost GOM je velmi dobrý diagnostický marker, ale pokud je odebrán vzorek kůže bez přítomnosti potřebných tepen, tak GOM nemusí být nalezen a dojde k falešně-negativnímu výsledku (Lackovic et al., 2008; Markus et al., 2002). Osvědčila se také metoda imunohistochemického barvení vzorků z biopsie kůže myši specifickou monoklonální protilátkou proti EGF-like repetitivním 17-21 (Joutel et al., 2001).

Pro diagnostické účely byly provedeny i biopsie nervu či svalu (Mayer et al., 1999; Ruchoux et al., 1994; Schröder et al., 2005), kde byly objeveny jak depozita GOM, tak i snížení počtu nervových vláken a atrofie axonů, patologické změny na svalových vláknech a abnormální tvar mitochondrií.

Protože laboratorní vyšetření je časově i finančně náročné, byl navržen seznam příznaků onemocnění s přiřazenými hodnotami podle jejich vazby k onemocnění CADASIL (Pescini et al., 2012). Čím vyšší hodnota, tím je symptom typičtější. Například migréna s aurou, poškození bílé hmoty mozkové a demence jsou ohodnoceny 3 body, klasické migrény či cévní mozkové

migrény s nástupem až po 50. roce pouze jedním bodem. Maximálně je možné přiřadit pacientovi 25 bodů. Pokud je přiřazeno minimálně 15, pacient by měl být doporučen ke genetickému vyšetření. Pomocí této tabulky by měli být vyloučeni pacienti se sporadickými onemocněními malých cév.

V České republice je v současné době protokol pro diagnostiku onemocnění CADASIL následovný: posouzení klinických příznaků včetně osobní a rodinné anamnézy, vyšetření mozku zobrazovací metodou (magnetická rezonance nebo počítačová tomografie), sekvenování PCR produktů pro exony 3 – 12 Sangerovou metodou. Pokud kauzální mutace není nalezena a podezření na onemocnění trvá, je podán návrh na sekvenování dalších exonů 1-2 a 13-23 nebo na provedení hluboké kožní biopsie k vyšetření elektronovou mikroskopií nebo imunohistochemicky. V případě negativních výsledků (s nálezem homozygotie pro několik polymorfismů) je možné provést vyšetření metodou MLPA.

3.1.8 Transkripční varianta X1

Podle NCBI anotačního pracovního postupu ([online], dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_euk/process/, [cit. 2017-01-25]) by se mohl lidský gen *NOTCH3* přepisovat do dvou variant transkriptu. První variantou je transkript NM_000435.2, který je využíván jako referenční sekvence a jeho existence je experimentálně potvrzená. Druhá transkripční varianta XM_005259924.4 se nazývá varianta X1 a její existence je zatím pouze předpokládána.

NCBI anotační pracovní postup vycházel v tomto případě z genomové sekvence NC_000019.10. Součástí automatické počítačové analýzy je program Gnomon, který na základě kombinace homologie a *ab initio* modelování dokáže předpovědět možné varianty genu.

V rámci mRNA ve variantě X1 chybí prvních 61 nukleotidů v 5'UTR oblasti oproti referenční sekvenci mRNA. Dále se liší tím, že v transkripční variantě X1 zcela chybí exon 16, tedy báze 2487 až 2642 referenční sekvence. Jedná se o 156 bazí, a proto nedochází k posunu čtecího rámce, ale dochází pouze ke změně jednoho aminokyselinového zbytku a delecí 52 aminokyselinových zbytků v predikovaném proteinu. V transkripční variantě X1 také chybí posledních 18 adenosinových zbytků.

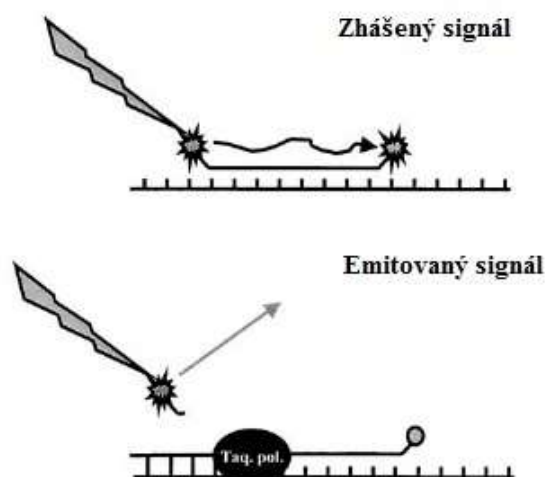
Translaci těchto transkripčních variant vzniká z referenční mRNA referenční sekvence proteinu NP_000426.2 a z transkripční varianty X1 izoforma X1 XP_005259981.1. Sekvence varianty X1 je kratší o sekvenci celé EGF-like repetice 21 a o několik aminokyselinových zbytků z EGF-like repetice 20 a 22. Jejich sekvenci odpovídá exon 16.

3.2 Metodika

3.2.1 Kvantitativní PCR v reálném čase

Kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR) představuje spolehlivou detekci a možnost měření množství vznikajícího produktu během každého cyklu polymerázové řetězové reakce (PCR) (Ginzinger, 2002). Během PCR reakce se zvyšuje fluorescenční signál, který je zaznamenáván přístrojem pro kvantitativní PCR v reálném čase, tzv. real-time termocyklerem. Metoda qPCR se využívá hlavně v oblastech mRNA expresních studií, měření počtu DNA kopií v genomové nebo virové DNA, počtu kopií transgenů, alelických diskriminačních přístupech a potvrzení dat z microarray. Díky sensitivitě této metody se dá využít i pro expresní analýzy specifických sestřihových variant genů a individuálních buněk z mikrodisekce, parafrinované tkáně nebo buněk z průtokového cytometru.

Zaznamenávání množství vznikajícího produktu probíhá s využitím fluorescence (Gibson et al., 1996; Ginzinger, 2002; Heid et al., 1996; Jian Lin Yin, Nicholas A. Shackel, Amany Zekry et al., 2001; Livak et al., 1995; Marras et al., 2006; Thornton and Basu, 2011; Tyagi and Kramer, 1996; Whitcombe et al., 1999). Nejpoužívanější fluorescenční reportérové systémy jsou Taq Man hydrolyzační sondy, molekulární majáky a Scorpions® sondy. Mimo sondy je možné využít k zaznamenávání množství vznikajícího produktu i interkalační fluorescenční barvu SYBR Green I. V této práci je využit systém založený na použití TaqMan hydrolyzačních sond, což jsou oligonukleotidy komplementární k části amplifikované oblasti s fluoroforem (např. reportérová barva FAM) na 5' konci a zhášecem (např. barva TAMRA) na 3' konci. Sonda hybridizuje ke komplementární sekvenci (Obr. 6), a pokud je fluorofor excitován, emise fluorescence je zhášena blízkostí zhášeče díky fluorescenčnímu rezonančnímu přenosu energie. Ale během PCR Taq DNA polymeráza díky své 5'-3' exonukleázové aktivitě dokáže během prodlužování řetězce odštěpit fluorofor hybridizované sondy, ten se dostane z blízkosti zhášeče a po excitaci je schopen emitovat fluorescenci.



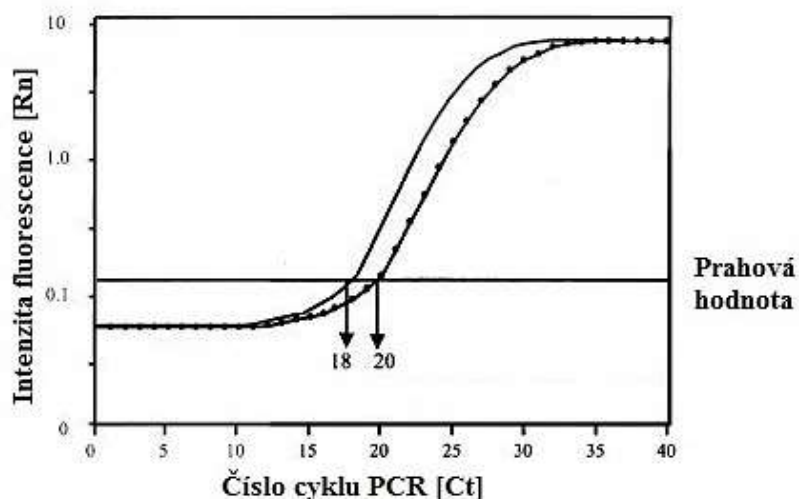
Obr. 6. Princip reportérového systému TaqMan. Při hybridizaci na DNA je excitovaný fluorofor zhášen blízkostí zhášedce. Při PCR však Taq DNA Polymeráza svojí 5'-3' exonukleázovou aktivitou odštěpí fluorofor, který se vzdálí od zhášedce a po excitaci dojde k emisi fluorescence. Upraveno podle (Ginzinger, 2002).

Systémy založené na sondách se využívají, pokud je potřeba vyšetřit menší množství genů. Sondy musí být specificky navrženy pro danou sekvenci a jak výroba, tak i ověřování funkčnosti je finančně nákladné. Jsou však velmi citlivé, jsou schopny zachytit méně než 10 kopií daného genu a poskytují výbornou reprodukcibilitu. Při jejich použití obvykle nedochází k falešně pozitivním výsledkům. Pokud je ale potřeba vyšetřit více genů, lze využít systému založeného na využití barvy SYBR Green I jako ekonomičtější volby. Při střední až vysoké expresi genu poskytuje i použití barvy SYBR Green I dostačující reprodukcibilitu.

Existují dva typy qPCR analýzy – absolutní a relativní kvantifikace (Ginzinger, 2002; Livak and Schmittgen, 2001). Pro absolutní kvantifikaci je potřeba vytvořit standardní ředící křivku vzorku o známé koncentraci a podle toho se kvantifikují vzorky o neznámé koncentraci. Pro stanovení standardní ředící křivky se nejčastěji používá plasmid s daným genem, syntetický oligonukleotid nebo buněčná linie se známým počtem kopií či hladinou exprese genu zájmu. Absolutní kvantifikace by měla být použita tam, kde je potřeba určit absolutní počet kopií transkriptu.

Naopak relativní kvantifikace je takový typ analýzy qPCR, při které nezískáme absolutní počet kopií, ale porovnává se počet kopií daného genu s počtem kopií kontrolního genu. Kontrolní gen musí být vybrán dle daného experimentu. Je možné použít jako kontrolu neošetřený vzorek, vzorek v čase 0 či jiný takový, ke kterému bude vztažena změna exprese či počtu kopií. Mezi sledovaným genem a kontrolním genem se porovnávají čísla cyklu, kdy fluorescence překročí danou prahovou hodnotu, tzv. cycle threshold (Ct). Hodnota Ct přímo odpovídá počátečnímu množství vkládaného templátu (Obr. 7). Produkt, kterého bylo vloženo

více, překročí prahovou hodnotu dříve, a tudíž hodnota Ct bude nižší než u produktu, kterého bylo na počátku vloženo menší množství. Protože při 100% účinnosti PCR reakce se množství templátu v každém PCR cyklu zdvojnásobí, rozdíl 2 mezi hodnotami Ct odpovídá 4krát více kopiím.



Obr. 7. Znáznornění hypotetického grafu výsledků z qPCR. Hodnoty Ct odpovídají číslu cyklu, ve kterém fluorescence překročila prahovou hodnotu. Na obrázku hodnoty Ct 18 a 20. Upraveno podle (Ginzinger, 2002).

Pro relativní kvantifikaci je potřeba zajistit také referenční gen. To musí být takový gen, jehož počet kopií či hladina exprese se nemění v různých vzorcích. Normalizace k referenčním genům vyrovnává rozdíly v množství vkládané DNA či RNA.

K analýze relativní genové exprese či změny počtu kopií genu lze využít metody $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001; Schmittgen et al., 2000).

$$\text{Změna genové exprese (počtu kopií)} = 2^{-\Delta\Delta Ct},$$

kde

$$\begin{aligned} \Delta\Delta Ct = & (Ct_{\text{daného genu}} - Ct_{\text{referenčního genu}})_{\text{experimentální podmínky}} - \\ & - (Ct_{\text{daného genu}} - Ct_{\text{referenčního genu}})_{\text{počáteční podmínky (kontrolní)}} \end{aligned}$$

Tento vzorec se dá využít i pro vyšetřování pacienta s podezřením na delecii či duplikaci části genu v následující úpravě:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{daného genu}} - Ct_{\text{referenčního genu}})_{\text{pacient}} - (Ct_{\text{daného genu}} - Ct_{\text{referenčního genu}})_{\text{kontrola}}$$

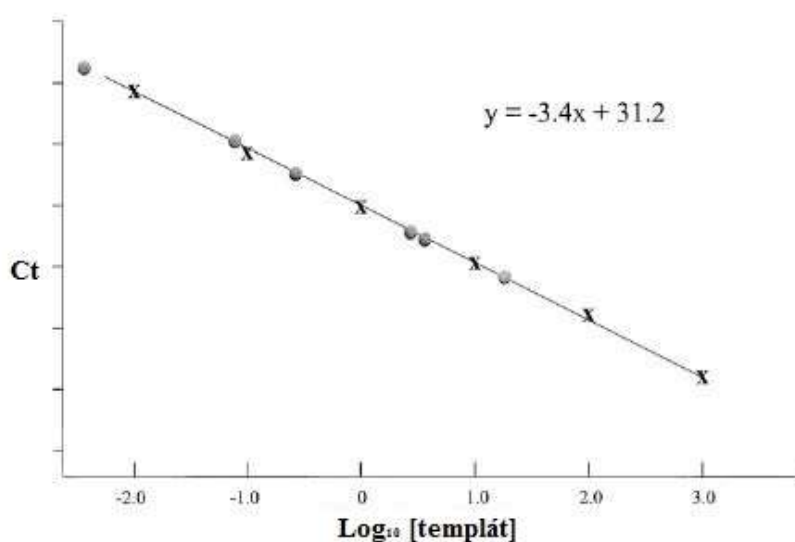
Této metody však lze využít jen tehdy, jestliže délka amplikonů je kratší než 150 bp a jestliže primery a množství hořčnatých iontů jsou v optimální koncentraci. Pak se efektivita

blíží 100 %. Pokud ne, je nutné upravit vzorec, aby bylo možné počítat s reálnou efektivitou reakce:

$$\text{Změna genové exprese (počtu kopií)} = (1 + E)^{-\Delta\Delta C_t},$$

kde E značí efektivitu. Efektivitu PCR je možné vypočítat z provedené reakce s desítkovou ředící řadou koncentrace templátu a vynesení získaných hodnot do grafu, kde hodnoty C_t jsou vyneseny jako funkce dekadických logaritmičeských hodnot koncentrace templátu (Obr. 8). Hodnota sklonu proložené regresní křivky (s) udává efektivitu reakce:

$$E = 10^{\left(\frac{1}{-s}\right)} - 1.$$



Obr. 8. Hypotetická standardní křivka pro výpočet efektivitu reakce. Do grafu jsou zaneseny hodnoty C_t jako funkce dekadických logaritmičeských hodnot koncentrace templátu. Z rovnice proložené regresní křivky lze odečíst sklon (s). V tomto případě $s = -3,4$. Podle výpočtu $E = 10^{\left(\frac{1}{-s}\right)} - 1$ vychází efektivita této reakce na 97 %. Upraveno podle (Ginzinger, 2002).

Ačkoliv nejčastěji se metoda qPCR využívá pro studium exprese a jako templát se vkládá cDNA, svoje uplatnění má tato metoda i při hledání velkých delecí či duplikací exonů (Ginzinger, 2002). Při této analýze se vkládá genomová DNA. K analýze lze využít jak absolutní, tak relativní kvantifikace. Důležitým předpokladem úspěšného pokusu je čistota DNA. Tato metoda dokáže detekovat změnu genové dávky tam, kde jsou výsledky Sangerova sekvencování negativní (Barrois et al., 2004; Majer et al., 2014). Poprvé byla taková analýza provedena vědeckou skupinou s vedoucí Ingrid Laurendeau (Laurendeau et al., 1999). Za použití TaqMan sond byly v zárodečné linii identifikovány delece v tumorových supresorech p16, p19 a p15. Tato metoda sloužila jako ověření výsledků z fyzikálního mapování mikrosatelitních markerů. Metoda qPCR byla absolutní a vycházela ze známého počtu kopií genu pro albumin.

Další použití qPCR s genomovou DNA jako vstupním materiálem bylo například v systematické studii zkoumající všech 12 exonů genu pro protein parkin u pacientů s brzkým nástupem parkinsonismu (Hedrich et al., 2001). Zde byla počáteční koncentrace vzorků vypočítána ze standardní křivky, a poté byla porovnávána koncentrace genu *PARK2* (gen kódující parkin) s koncentrací genu pro β globin. Podle autorů této studie je tato metoda qPCR vhodná i pro další geny a onemocnění.

V další studii byla metoda qPCR s genomovou DNA použita ke srovnání s metodou fluorescenční hybridizací in situ (FISH) (Kariyazono et al., 2001). Tyto dvě metody byly využity k rozeznání delece 22q11.2. Přestože se jedná o delecii způsobující DiGeorgeův syndrom a klasickým vyšetřováním byla právě metoda FISH, metoda qPCR poskytla rychlejší, jednodušší a levnější alternativu. Dvojnásobný rozdíl v počtu kopií byl dobře rozeznatelný, avšak 1,5násobný rozdíl už bylo problematické určit. Závěrem bylo určeno, že u některých případů je nutné provést i metodu FISH pro kontrolu.

Kvantitativní PCR v reálném čase byla prováděna i při hledání změny počtu kopií jednotlivých exonů v genu *BRCA1* (Barrois et al., 2004) a *LAMP2* (Majer et al., 2014). Pomocí této metody byly určeny duplikace a další přestavby zkoumaných genů.

Některé laboratoře pro výzkum velkých delecí či duplikací zavedli metodu vícenásobné amplifikace využívající sondy závislé na ligaci (multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA). Kvantitativní PCR v reálném čase tak bylo využito například pro potvrzení delece jednoho exonu v genech *MLH1* a *MSH2*, která byla nejprve identifikována právě pomocí metody MLPA (Vaughn et al., 2008). Výsledky MLPA zcela odpovídaly výsledkům qPCR. Při výzkumu onemocnění hyperfenylalaninémie byly použity metody MLPA, srovnávací vícenásobná analýza genové dávky (comparative multiplex dosage analysis, CMDA) a qPCR (Cali et al., 2010). Závěrem autoři doporučili používat metodu MLPA jako hlavní a ostatní použité analyzační metody používat jen pro ověření výsledků. Kombinace metody MLPA a qPCR byla doporučena i ve studii zabývající se kvantitativní analýzou genu pro dystrofin (Maksimovic et al., 2012).

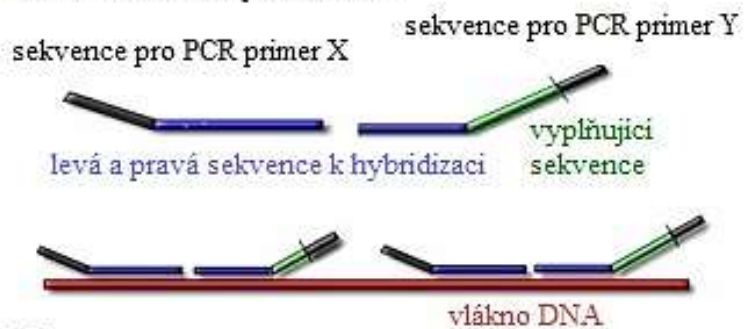
Kromě využití metody qPCR s genomovou DNA pro studium velkých delecí či duplikací, bylo této metody využito i při genotypování genu *CYP2D6*, který se účastní metabolismu více než 20 % léků, při určování pohlaví dítěte z plasmy matky, při analýze mikrosatelitů v souvislosti s leukémií i při vysoce rozlišující analýze pomocí oligonukleotidových DNA čipů (Bignell et al., 2004; Ginzinger et al., 2000; Ho et al., 2015; Schaeffeler et al., 2003).

3.2.2 Vícenásobná amplifikace využívající sondy závislé na ligaci (multiplex ligation-dependent probe amplification)

Metodu vícenásobné amplifikace využívající sondy závislé na ligaci (MLPA) lze využít k analýze rozsáhlých delecí či duplikací v genu, ale i k analýze DNA methylace, ke stanovení SNP genotypů či k mRNA kvantifikaci (Schouten et al., 2002; [online], dostupné z: <http://www.biogen.cz/mlpa-kity>, [cit. 2017-01-11]). Výhodou této metody je potřeba pouze malého množství DNA.

Pro tuto metodu jsou potřeba páry sond (Obr. 9), které nesou jak sekvenci komplementární k cílové sekvenci, tak i sekvenci komplementární k univerzálnímu hornímu či dolnímu primeru. Kromě cílové sekvence se páry sond liší také svojí délkou, díky různě dlouhé vyplňující sekvenci. Různá délka slouží k odlišení sond a následné identifikaci, díky které je možné testovat mnoho míst v genomu najednou. Po prvním kroku amplifikace – denaturaci DNA následuje hybridizace sond s vláknem DNA. Páry sond, které nasednou těsně vedle sebe, jsou v následném kroku spojeny pomocí enzymu ligázy. Dále proběhne PCR reakce s univerzálními primery, během níž dojde k namnožení pouze spojených sond. Posledním krokem je fragmentační analýza, kdy dojde k separaci fragmentů podle jejich délky. Z výsledného elektroferogramu se srovnáním testovaných a kontrolních vzorků určí možné delece či duplikace.

Denaturace a hybridizace



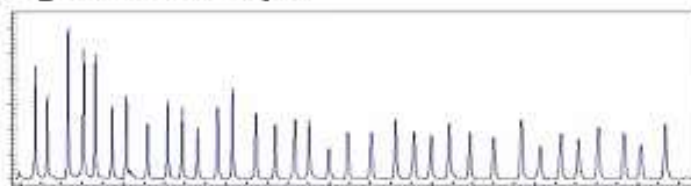
Ligace



PCR s univerzálními primery X a Y



Fragmentační analýza



Obr. 9. Schéma průběhu reakce metody MLPA. Upraveno podle (<http://www.biogen.cz/mlpa-kity>).

4 Materiál a metody

4.1 Soubor pacientů

Soubor pacientů pro vyšetření transkriptu byl omezen tím, že bylo potřeba dodat čerstvě odebranou krev pro izolaci RNA. Byly použity vzorky od 6 pacientů (Tab. 2). K vyšetření metodou kvantitativní PCR v reálném čase byly použity vzorky od 6 suspektních pacientů (Tab. 3) a vzorky dalších 4 pacientů byly použity k pokusu ke zjištění citlivosti této metody (Tab. 4). Vzorky odebrané zdravým jedincům byly použity k optimalizaci metod a jako kontrolní vzorky. Vždy byla odebrána periferní krev do zkumavky s antikoagulačním činidlem EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová). Všichni pacienti a kontroly podepsali informovaný souhlas s provedením genetického vyšetření a s využitím k výzkumu.

Tab. 2. Klinická a molekulárně genetická charakteristika pacientů, jejichž vzorky byly vyšetřeny metodou analýzy transkriptu.

Pacient	Pohlaví	Rok narození	Nalezená varianta na úrovni DNA	Popis varianty	RA	CMP	Migrény	Postižení bílé hmoty mozku (MRI)	GOM	Imunohistochemie	Další příznaky
1	muž	1967	c.218G>A; p.G73V	nepopsaná	+/-	+		+			neklidný, výbuchy smíchu, křiku, nekoordinované pohyby končetin, změna chování
2	žena	1958	c.1490C>T; p.S497L	popsaná* pravděpodobně nepatogenní	-	-		+		-	
3	muž	1955	c.1725G>A; p.T575=	nepopsaná	+	+		+			snížení kapacity bezprostřední verbálně-sluchové paměti, mírné deprese, únava, slabost
4	žena	1983	c.1725G>A; p.T575=	nepopsaná	-	-	-	+			ztráta sluchu vpravo (ale problémy se sluchem od dětství)
5	muž	1983	c.1725G>A; p.T575=	nepopsaná	-	+		+/-			CMP ve 23 a 29 letech
16	žena	1976	c.3601C>A; p.R1201S	nepopsaná		+			-		levostranná hemiparéza, porucha řeči následkem CMP

Zkratka RA značí rodinnou anamnézu, CMP cévní mozkové příhody, MRI magnetickou rezonanci a GOM granulární osmiofilní materiál. + znamená přítomnost znaku v osobní anamnéze, - nepřítomnost, +/- nejasné a nevyplněná políčka nejsou v dodaných dokumentech od lékaře. * (Schmidt et al., 2011)

Tab. 3. Klinická a molekulárně genetická charakteristika pacientů, jejichž vzorky byly vyšetřeny metodou qPCR.

Pacient	Pohlaví	Rok narození	Homozygotní pro SNP	RA	CMP	Migrény	Postižení bílé hmoty mozku (MRI)	GOM	Imuno-histochemie	Daší příznaky
6	muž	1947	+ 9/10	+			+			kognitivní zhoršení
7	žena	1958	+ 9/10				+			kognitivní zhoršení, potíže s artikulací, deprese
8	žena	1966	-	-			+	-	+	opakované pády, bolesti hlavy, únava, deprese
9	žena	1968	+ 8/10	+		-	+			silné bolesti hlavy (ne migrény), parestézie horních končetin
14	žena	1990	+ 2/10	+	+	+	+			
15	muž	1975	+ 8/10	+		+	+			parestézie horních končetin

Číslo ve sloupci Homozygotní pro SNP udává počet nalezených homozygotních jednonukleotidových záměn z 10 testovaných. Zkratky vysvětleny v popisu Tab. 2.

Tab. 4. Přehled pacientů, jejichž vzorky byly použity k pokusu pro zjištění citlivosti metody qPCR s využitím restrikčního enzymu.

Pacient	Pohlaví	Rok narození	Haplotyp pro SNP c.2538C>T
10	žena	1957	T/T
11	muž	1957	C/C
12	žena	1971	C/T
13	žena	1957	C/T

SNP značí jednonukleotidový polymorfismus.

4.2 Chemikálie a roztoky

Chemikálie

75-100% (v/v) ethanol
ApaI (10000 U/ml)
BclI (10 U/μl)
β-merkaptoethanol
Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit
Big Dye XTerminator® Purification Kit
BiOstic Blood Total RNA Isolation Kit
Buffer G 10×
CentriPure Dye Terminator – 96-well plates
CutSmart® Buffer 10×
Deep Vent® DNA Polymerase
Dimethylsulfoxid (DMSO)
DNA Gel Loading Dye 6×
5% (v/v) DMSO
dNTPs
GelRed 20 000×
Gene Ruler 100bp DNA Ladder Plus
GeneScan 500 ROX
Hi-Di™ Formamide
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit
KlenTaqI
LightCycler® 480 Probes Master
PC2 pufr
PCR agaróza
PPP Master Mix
primery
SALSA MLPA probemix P071-A1 Leukodystrophy
SALSA MLPA reagents for DNA analysis
Qubit® dsDNA HS Assay Kit
QIAamp DNA Blood Mini Kit
UPL sondy

Roztoky

0,9% (w/v) fyziologický roztok
10× TBE pufr

10× TE pufr

PBS

Výrobce

Penta, Praha
New England BioLabs, USA
Fermentas, USA
Sigma-Aldrich, USA
ThermoFisher Scientific, USA
ThermoFisher Scientific, USA
MO BIO Laboratories, USA
Fermentas, USA
Genaxxon Bioscience, Německo
New England BioLabs, USA
New England BioLabs, USA
Sigma-Aldrich, USA
Applied Biosystems, USA
Sigma-Aldrich, USA
LAROVA, Německo
Biotium, USA
ThermoFisher Scientific, USA
Applied Biosystems, USA
Applied Biosystems, USA
Applied Biosystems, USA
GeneAge Technologies, Praha
Roche, Švýcarsko
Sigma-Aldrich, USA
Top-Bio, Praha
Top-Bio, Praha
Generi Biotech, Hradec Králové
MRC-Holland, Nizozemí
MRC-Holland, Nizozemí
ThermoFisher Scientific, USA
QIAGEN, Německo
Roche, Švýcarsko

Složení

154 mM Na⁺, 154 mM Cl⁻
89 mM Tris, 89 mM kyselina boritá,
2 mM EDTA, pH 8,3
10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA,
pH 8,0
146 mM NaCl, 2,68 mM KCl,
8,1 mM Na₂HPO₄ · 7 H₂O,
1,47 mM KH₂PO₄, pH 7,4

4.3 Použité primery

Primery byly navrženy pomocí programů Oligo6 (od firmy Molecular Biology Insights, Inc., DBA Oligo, Inc.) a PrimerBlast.(Ye et al., 2012).

Primery pro kontrolu kvality přepisu cDNA:

ABL3-AS 5' - TGTGATTATAGCCTAAGACCCGGAGCTTTT - 3'

ABL2-S 5' - TTCAGCGGCCAGTAGCATCTGACTT - 3'

Primery pro vyšetření transkriptu:

Grafické znázornění míst nasedání použitých primerů na sekvenci cDNA genu *NOTCH3* je uvedeno v Příloze 1.

Sekvence primerů jsou uváděny ve směru 5' – 3'.

Sekvence TAATACGACTCACTATAG je přidaná sekvence, tzv. overhang pro přímý sekvenační primer, a sekvence tgaacagctatgaccatg pro reverzní sekvenační primer. Tyto sekvence jsou komplementární k univerzálním primerům T7 (pro přímý směr) a RP (pro reverzní směr) pro sekvenování.

Fragment 1a, délka 333 bp

n_NOTCH3-fr1a_U TAATACGACTCACTATAG AGCCCAGGGAAGGAGGGA

n_NOTCH3-fr1a_L tgaacagctatgaccatg TGAGTGACAGGGGTCCTCCA

Fragment 1b, délka 337 bp

n_NOTCH3-fr1b_U TAATACGACTCACTATAG GTGTGCAAATGGAGGTCGTTG

NOTCH3-fr1-L tgaacagctatgaccatg GGTGGGCAGGAGCAGAGGA

Fragment 2, délka 595 bp

NOTCH3-fr2-U TAATACGACTCACTATAG CTTCCGAGGCCCTGACTG

NOTCH3-fr2-L tgaacagctatgaccatg CCACCCAGCGTGTTGAAGC

Fragment 3pn, délka 541 bp

NOTCH3-fr3-U TAATACGACTCACTATAG TGCCAGTGCCCTCCTGAGT

n_NOTCH3-fr3-L tgaacagctatgaccatg GCGAGGTCCAGTGTAGCCAC

Fragment 3c, délka 493 bp

n_NOTCH3_fr3c_U TAATACGACT-CACTATAG ACCGCGTGGCTTCTTTCTAC

NOTCH3-fr3-L tgaacagctatgac-catg CCCACCGTTGACACAGG

Fragment 4, délka 509 bp

NOTCH3-fr4-U TAATACGACTCACTATAG ATAGGCCAGTTCACCTGTAT

NOTCH3-fr4-L tgaacagctatgaccatg GGCAGAGGTACTTGTCCA

Fragment 5, délka 493 bp

NOTCH3-fr5-U TAATACGACTCACTATAG CAGCCCGATGGCTACGAG

NOTCH3-fr5-L tgaacagctatgaccatg TTCCCCATCCACACAGGAAC

Fragment 6n, délka 679 bp

NOTCH3-fr6-U TAATACGACTCACTATAG CTGCCCTTCTGGGACCAC

n_NOTCH3-fr6-L tgaacagctatgaccatg GAAACTCCCTGCCAGGTTGG

Fragment 7n, délka 421 bp

n_NOTCH3-fr7-U TAATACGACTCACTATAG TGGCCCTCATGGTATCTGCAC

NOTCH3-fr7-L tgaacagctatgaccatg TTGGCAGTGGGCTCCTGTG

Fragment 8, délka 716 bp

NOTCH3-fr8-U TAATACGACTCACTATAG CACGTGGCCTCCTTCACCT

NOTCH3-fr8-L tgaacagctatgaccatg GCTGGGAGGCACACTCGTC

Fragment 9, délka 775 bp

NOTCH3-fr9-U TAATACGACTCACTATAG GTAGCCACTGTGAGCAGGAGG

NOTCH3-fr9-L tgaacagctatgaccatg AGGAGGGTCCCGACAACC

Původní primery pro namnožení fragmentu 7:

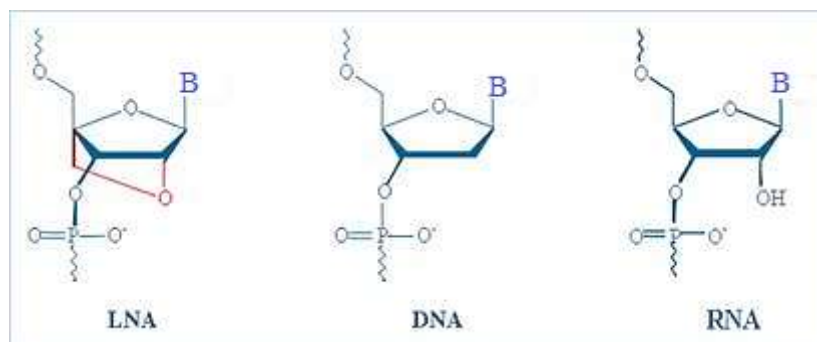
NOTCH3-fr7-U TAATACGACTCACTATAG GTGGGACATGCAGCAGCGA

NOTCH3-fr7-L tgaacagctatgaccatg TTGGCAGTGGGCTCCTGTG

Sondy použité pro kvantitativní PCR v reálném čase

Pro metodu qPCR byly použity sondy z univerzální knihovny sond od firmy Roche (UPL sondy). Univerzální knihovna sond obsahuje 165 krátkých hydrolyzačních sond, které jsou na 5' konci značené fluoresceinem (FAM) a na 3' konci zhášecí barvou (dark quencher dye) ([online], dostupné z: https://lifescience.roche.com/en_cz/articles/Universal-Probe-Library-System-Technology.html], [cit. 2017-01-04]). Jejich délka je 8 – 9 nukleotidů, díky čemuž je zajištěno vysoké pokrytí celého transkriptomu. Do sekvence sond jsou inkorporovány uzamčené nukleové kyseliny (LNA), což jsou analogy RNA nukleotidů, u kterých je ribózový

kruh uzavřen methylovým mostem spojujícím 2'-O atom se 4'-C atomem (Obr. 10). Toto uzavření zesiluje stohování bazí a zvyšuje termální stabilitu. LNA nukleotidy obsahují 6 nejčastějších bazí – T, C, G, A, U a mC a mohou být smíchány s DNA či RNA nukleotidy.



Obr. 10. Rozdíl mezi LNA, DNA a RNA nukleotidy. V rámci LNA nukleotidu je červeně vyznačen methylový most. Modré B značí libovolnou bázi. Upraveno podle Universal ProbeLibrary System Technology, [online].

Pomocí softwaru ProbeFinder (Exiqon) byly navrženy optimální kombinace PCR primerů a sond. Sekvence primerů jsou uvedeny ve směru 5' – 3'.

Název primeru	Sekvence primeru	Číslo sondy
NOTCH3_ex1_16_U	gagtgaagaacccccaaag	16
NOTCH3_ex1_16_L	cctccaggactggcatga	
NOTCH3_ex2_27_U	caaatggaggctggtgcac	27
NOTCH3_ex2_27_L	ctctgagccaggcactcac	
NOTCH3_ex3_83_U	cgtggtgtctgccagagtt	83
NOTCH3_ex3_83_L	tccagacttctccctctca	
NOTCH3_ex4_13_U	accctcaccatgccgtaac	13
NOTCH3_ex4_13_L	ggcacagtcgtaagtgaggtc	
NOTCH3_ex5,6_16_U	ccctcctgagtggacagg	16
NOTCH3_ex5,6_16_L	cacagatgcagcagtccag	
NOTCH3_ex7,8_55_U	tgaatgggctgggaaaga	55
NOTCH3_ex7,8_55_L	atggagtgcgatcggtgt	
NOTCH3_ex9_43_U	ccgcttcctaagccctatt	43
NOTCH3_ex9_43_L	tcaatgtccacctcgcaat	
NOTCH3_ex10_19_U	ggttttccacccaacaag	19
NOTCH3_ex10_19_L	ccagaaagggtgagagcagt	

NOTCH3_ex11_32_U	ggagcctgaccctcttgg	32
NOTCH3_ex11_32_L	atgagaagctggcgatgc	
NOTCH3_ex12_72_U	tctagtggggcacagtgg	72
NOTCH3_ex12_72_L	ttcacttcgcagttcacacc	
NOTCH3_ex13_81_U	tccctgctgactttgttctg	81
NOTCH3_ex13_81_L	ctcattgatctccacgttacaaa	
NOTCH3_ex14_86_U	atgcagcagcgatggaat	86
NOTCH3_ex14_86_L	ggtgaggtacacaccctgga	
NOTCH3_ex15_38_U	ggagatgggatcagggagtc	38
NOTCH3_ex15_38_L	ggagaggagttcacactgacg	
NOTCH3_ex16_4_U	cctgccatggagggtaca	4
NOTCH3_ex16_4_L	ctgcactcactggggtcac	
NOTCH3_ex17_69_U	aatgggggcaaggtaggt	69
NOTCH3_ex17_69_L	gttcaggcatgggtctgc	
NOTCH3_ex18_78_U	cctccctcccactccttc	78
NOTCH3_ex18_78_L	agttcacgccgtccacac	
NOTCH3_ex19_58_U	ctggggcctattgccttt	58
NOTCH3_ex19_58_L	agcttcggatgtcacagagg	
NOTCH3_ex20_28_U	tectgtgccactctccttt	28
NOTCH3_ex20_28_L	agtgggagctgtcttcatcc	
NOTCH3_ex21_72_U	ccctctcttaccctactgaa	72
NOTCH3_ex21_72_L	ccacgtcgtcctcacagtta	
NOTCH3_ex23_25_U	gtgcccaggtaggtgtgg	25
NOTCH3_ex23_25_L	cacgcccctactactccaga	
ALB_i14_313F	ggtacacagagccatccaagt	86
ALB_i14_378R	ggttcagcctaattcccaga	
RNAseP_i10_253F	tgccgacattttgataggc	7
RNAseP_i10_318R	gaaagcatggccttctggt	
LAMP2_i2_1013F	cctacataaatgcttggtgttcc	27
LAMP2_e3_211_R	tgccatggtctgaaatggt	

4.4 Metody

Všechny postupy byly prováděny v laboratorních rukavicích a byly dodržovány základní laboratorní návyky, aby se předešlo kontaminacím či záměně vzorků.

4.4.1 Izolace DNA

Izolace DNA z periferní krve odebrané do zkumavky s antikoagulačním činidlem EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová) byla prováděna při laboratorní teplotě v DNA/RNA UV dekontaminačním boxu sadou QIAamp DNA Blood Mini Kit firmy QIAGEN (Hilden, Německo). Izolace touto sadou probíhá na principu vazby DNA na povrch z oxidu křemičitého za přítomnosti chaotropních solí a je vhodná k izolaci DNA z čerstvé i zamražené krve, plasmy nebo séra, kostní dřeně, lymfocytů, pelety buněk i různých tělesných tekutin.

Sada obsahuje

- AE pufr – roztok pro eluci DNA z kolonky, obsahuje 10mM Tris-Cl a 0,5 mM EDTA, pH 9,0
- AL pufr – lyzační a zároveň chaotropní činidlo pro rozpad buněk a vazbu DNA na kolonku díky vysoké koncentraci chaotropních solí
- AW1 pufr – promývací roztok s nízkou koncentrací chaotropních solí
- AW2 pufr – promývací roztok obsahující 70% (v/v) ethanol pro odstranění solí
- QIAGEN Proteáza.

Dále byl použit 96-100% (v/v) ethanol a fosfátový pufr PBS (pH = 7,4).

Izolace byla prováděna podle zavedeného pracovního postupu Laboratoře DNA diagnostiky ÚDMP (dále jen Laboratoře). Při izolaci z čerstvé krve bylo do jedné zkumavky napietováno 20 μ l QIAGEN proteázy, při izolaci ze zamražené krve byla izolace prováděna do dvou zkumavek z dvojnásobného množství výchozího materiálu. K proteáze bylo přidáno 200 μ l krve. Pokud bylo krve v odběrové nádobce méně, byl objem doplněn fosfátovým pufrem. Ke vzorku bylo přidáno 200 μ l AL pufru a obsah zkumavky byl promíchán na vortexu po dobu 15 s. Vzorky byly inkubovány 10 min při 56 °C v termobloku a poté krátce stočeny na centrifuze. Do zkumavky bylo přidáno 200 μ l 100% (v/v) ethanolu, promícháno na vortexu po dobu 15 s a opět krátce stočeno na centrifuze. Vzorek byl přenesen na kolonku v nové zkumavce a byl centrifugován při 8000 \times g po dobu 1 minuty. Eluát byl vylit do nádoby na tekutý odpad. Na kolonku bylo napietováno 500 μ l AW1 pufru a centrifugováno při 8000 \times g po dobu 1 minuty. Eluát byl vylit do nádoby na tekutý odpad. Na kolonku bylo napietováno 500 μ l AW2 pufru a centrifugováno při 14000 \times g po dobu 3 minut. Eluát byl vylit do nádoby na tekutý odpad. Vzorek v kolonce byl centrifugován při 14000 \times g po dobu 1 minuty. Kolonka byla přenesena

do čisté zkumavky a bylo do ní napipetováno 80 µl AE pufru. Kolonka byla inkubována při laboratorní teplotě po dobu 3 minut, a poté centrifugována při 8000×g po dobu 1 minuty. Eluát s DNA byl přenesen do označené zkumavky. Změření koncentrace a kontrola čistoty izolované DNA byla provedena spektrofotometricky na spektrofotometru BioSpec-nano Micro-volume UV-Vis Spectrophotometer (Shimadzu) podle protokolu 4.4.7.1 a vzorek byl uchováván v lednici při 2 až 12 °C.

4.4.2 Izolace celkové RNA

Pro izolaci RNA byla použita periferní krev odebraná do zkumavky s antikoagulačním činidlem EDTA dopravená do laboratoře v co nejkratším čase při laboratorní teplotě. Izolace byla provedena sadou BiOstic Blood Total RNA Isolation Kit od firmy MO BIO Laboratories, dodávané firmou Elisabeth Pharmacon. Tato sada je vhodná k izolaci RNA z leukocytů, monocytů, lymfocytů, ale i ze suché pelety buněk a z nativních choriových klků. Izolace touto sadou probíhá na principu vazby RNA na povrch z oxidu křemičitého za přítomnosti chaotropních solí. Izolace byla prováděna podle zavedeného pracovního postupu Laboratoře.

V sadě jsou dodávány tyto roztoky:

BR1 – hypotonický roztok pro rozpad červených krvinek

BR2 – chaotropní činidlo pro rozpad bílých krvinek, stabilizuje RNA

BR3 – roztok obsahující 70% (v/v) ethanol a způsobující vazbu RNA na membránu kolonky

BR4 – promývací roztok, inaktivuje DNázu I a omývá zbytky enzymu

BR6 – promývací roztok na bázi ethanolu pro odstranění solí a kontaminantů z kolonky

BR7 – vysoce čistá voda (bez RNáz)

Izolace RNA z krve byla prováděna při laboratorní teplotě v DNA/RNA UV dekontaminčním boxu, který byl před izolací vyčištěn RNaseZAP roztokem.

Těsně před započítím izolace RNA bylo přidáno 6 µl beta-merkaptoethanolu do 600 µl roztoku BR2, tak byl připraven lyzační roztok. K lyofilizované DNáze I byl přidán roztok BR7 v množství odpovídajícím počtu izolací:

20 izolací = 750U ... přidat 150 µl vody.

Tento roztok DNázy I bylo potřeba rozpipetovat na alikvóty po 5 µl do mikrozskumavek. Právě nepoužívané mikrozskumavky s alikvóty byly uchovávány v mrazáku v -20 °C.

Postup uvedený dále je určen pro výchozí objem krve 1000 µl. Pro jiné objemy krve bylo použito množství roztoků BR1, BR2 a BR3 dle tabulky Tab. 5.

Tab.5. Množství roztoků podle výchozího objemu krve.

Objem krve	Předpokládaný počet bílých krvinek	Objem BR1 roztoku	Objem BR2 roztoku	Objem BR3 roztoku
50 µl	2.5×10^5	250 µl	300 µl	300 µl
100 µl	5.0×10^5	500 µl	300 µl	300 µl
200 µl	1.0×10^6	1 ml	300 µl	300 µl
500 µl	2.5×10^6	2,5 ml	300 µl	300 µl
1000 µl	5.0×10^6	5 ml	600 µl	600 µl
1500 µl	7.5×10^6	7,5 ml	600 µl	600 µl
2000 µl	1.0×10^7	10 ml	650 µl	650 µl

Prvním krokem izolace byla lýza červených krvinek. 1000 µl nesrážlivé krve bylo přepipetováno do přiložené 15ml sběrové zkumavky. K tomu bylo přidáno 5 ml roztoku BR1. Obsah zkumavky byl 4× promíchán převrácením. Následovala inkubace 10 minut při pokojové teplotě, během níž byla zkumavka 3× překllopena. Poté byla zkumavka centrifugována 5 min při 2000×g. Na dně zkumavky vznikla peleta bílých krvinek a supernatant byl vylit do odpadu. Peleta byla ještě dvakrát promyta přidáním 2 ml roztoku BR1 a opatrným promícháním špičkou pipety a centrifugována 5 min při 2000×g pro odstranění hemoglobinu. Supernatant byl vylit do odpadu, zkumavka byla postavena dnem vzhůru na buničitou vatu a ponechána 1 min na vykapání, zkumavkou bylo několikrát důkladně poklepáno, aby bylo zbaveno červeného barviva.

Následovala lýza bílých krvinek. Do 600 µl roztoku BR2 bylo přidáno 6 µl beta-merkaptoethanolu. Tento roztok byl napipetován k peletě buněk a promíchán na vortexu 1-2 min na plnou rychlost, dokud nebyl roztok homogenní. Jestliže vzorek nebyl kompletně resuspendován, bylo pokračováno dalším mícháním. Pro vazbu RNA na kolonku a její promytí bylo přidáno 600 µl BR3 roztoku a jemně promícháno špičkou. Polovina vzorku byla přepipetována do kolonky a centrifugována 30 s při 10000×g a eluát byl následně vylit. Zbývající vzorek byl přepipetován do kolonky a znovu centrifugován 30 s při 10000×g, eluát byl vylit. Na kolonku bylo přidáno 400 µl roztoku BR4, centrifugováno 1 min při 10000×g. Eluát byl vylit a zkumavka s kolonkou byla centrifugována na suchu 1 min při 10000×g. Tímto krokem byl odstraněn roztok BR4, který by mohl inhibovat DNázovou aktivitu. Kolonka byla přenesena do nové 2ml sběrné zkumavky. Pracovní roztok DNázy byl připraven smícháním 45 µl roztoku BR5 s 5 µl předem připraveného roztoku DNázy I. Do středu filtru kolonky bylo přidáno 50 µl pracovního roztoku a zkumavka byla inkubována 30 min při laboratorní teplotě. Poté bylo přidáno

400 µl roztoku BR4 a zkušavka s kolonkou byla centrifugována 1 min při 10000×g, eluát byl vylit. Pro konečné promytí bylo přidáno 500 µl roztoku BR6 na kolonku a zkušavka s kolonkou byla centrifugována 1 min při 10000×g, eluát byl vylit. Promytí bylo zopakováno dalšími 500 µl roztoku BR6 a opět bylo centrifugováno 1 min při 10000×g. Eluát byl vylit a zkušavka s kolonkou byla centrifugována na sucho 2 min při 10000×g. Kolonka byla vložena do čisté 2ml sběrné zkušavky a bylo přidáno 50 µl roztoku BR7 na střed filtru a ten byl inkubován 1 min při laboratorní teplotě, poté centrifugován 1 min při 10000×g. Kolonka byla vyhozena, sběrná zkušavka uzavřena. Pro interní kontrolu kvality byla izolovaná RNA změřena spektrofotometricky na spektrofotometru BioSpec-nano Micro-volume UV-Vis Spectrophotometer (Shimadzu) podle protokolu 4.4.7.1. Izolovaná RNA byla uchovávána v mrazáku při -80 °C.

4.4.3 Reverzní transkripce

4.4.3.1 *High Capacity RNA-to-cDNA Kit*

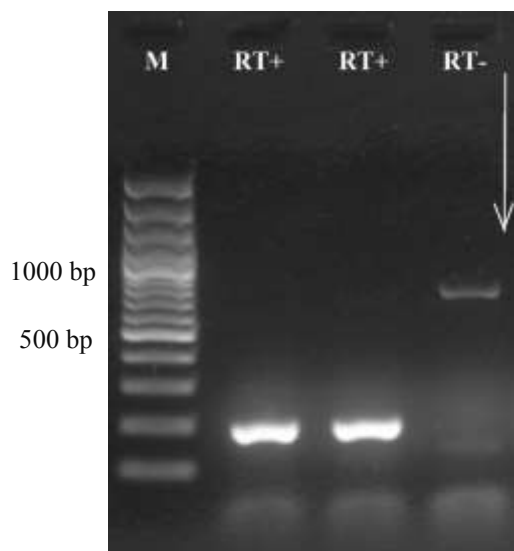
Přepis mRNA do cDNA byl prováděn sadou High Capacity RNA-to-cDNA Kit od firmy Applied Biosystems. Tato sada využívá pro přepis jak oligo dT-16 primer, tak i náhodné primery, což jsou hexanukleotidy nasedající náhodně po celém vlákně RNA. Ačkoliv je tak získána směs kratších cDNA, jejich délka je pro další použití dostatečná a výtěžnost přepisu by měla být vyšší.

Postup přepisu byl prováděn podle zavedeného pracovního postupu Laboratoře. Do mikrozkušavky bylo na 20µl reakci použito 10 µl pufru 2×RT Buffer, 0,8 µl roztoku 20× Enzyme Mix přímo z mrazíciho stojánku, 300 ng RNA a reakce byla doplněna vodou s přídatkem DEPC (diethyl pyrokarbonát) do 20 µl. Negativní transkripční kontrola byla připravena do objemu 10 µl ve stejném poměru, ale místo přidání enzymu byla přidána voda. Reakce byla promíchána opakovaným nasátím do špičky pipety a vypuštěním. Mikrozkušavka byla krátce centrifugována a vložena do termocykleru Mastercycler® personal (Eppendorf). Reverzní transkripce probíhala 60 min při 37 °C, poté byl enzym inaktivován 5 min při 95 °C, a nakonec byla reakce zchlazena na 15 °C.

4.4.3.2 *Kontrola kvality přepisu cDNA*

Syntéza cDNA byla ověřena přípravou PCR produktu pro část genu *ABLI*. Tato reakce byla použita pro kontrolu čistoty a funkčnosti cDNA. Horní primer pro tuto reakci byl navržen podle (Melo et al., 1994) a spodní primer pracovníky laboratoře tak, aby PCR produkt pro genomovou DNA zahrnoval intronovou oblast. Proto pokud syntéza cDNA proběhla úspěšně, měl

by se amplifikovat pouze fragment dlouhý 201 bp, ale při kontaminaci genomovou DNA se amplifikuje i fragment o délce 764 bp (Obr. 11).



Obr. 11: Elektroferogram pro kontrolu kvality přepisu cDNA. Dvě reakce s přidáním reverzní transkriptázy (RT+) a jedna kontrolní reakce bez enzymu (RT-). V reakcích s enzymem došlo k namnožení pouze produktu o délce 201 bp. V reakci bez enzymu byl namnožen úsek odpovídající genomové DNA o délce 764 bp. M – 100bp marker molekulových vah. Množství PCR produktů vložených na gel bylo 5 μ l. Elektroforéza probíhala v 1% TBE agarózovém gelu při 12 V/cm 30 min.

Reakce PCR byla provedena podle protokolu uvedeném v kapitole 4.4.4 v objemu 10 μ l a reakční mix obsahoval 5 μ l PPP Master Mix, 3,8 μ l H₂O, 0,4 μ l 5% (v/v) DMSO a 0,3 μ l 10 μ M směsi primerů (ABL2-S, ABL3-AS). Do reakce bylo přidáno 0,5 μ l přepsané cDNA nebo vody jako slepý vzorek. Teplotní profil reakce byl následovný:

Teplota [°C]	Čas	Opakování
94	2 min.	1×
94	30 s	34×
58	15 s	
71	1 min	
71	5min	1×
15	nekonečno	1×

Po skončení reakce byl PCR produkt nanesen na 1% agarózový gel, příprava byla provedena podle protokolu 4.4.5, a po proběhnutí elektroforézy v TBE pufru byla velikost produktů zkontrolována pod UV světlem. Správně syntetizovaná cDNA byla uchovávána v alikvótech při -80 °C.

4.4.4 Polymerázová řetězová reakce

Pro namnožení určitého úseku DNA byla použita polymerázová řetězová reakce (PCR). Postup přípravy PCR byl prováděn podle zavedeného pracovního postupu Laboratoře. Hlavní rozdíly mezi reakcemi tvořily teplotní profily reakcí, přídavné látky (aditiva) a množství DNA. Reakce PCR byly uskutečněny v objemu 10 nebo 25 μl na chladícím stojánku. Všechny reagenty před použitím byly promíchány na vortexu a krátce centrifugovány.

Nejčastěji byla PCR reakce prováděna s roztokem PPP Master Mix (Top-Bio), který již obsahuje Taq DNA polymerázu, deoxynukleotidy a optimalizovaný reakční pufr s MgCl_2 , aditivy, stabilizátory a barvivem, které umožňuje nanášení na elektroforetický gel ihned po skončení PCR reakce. Roztoku PPP Master Mix bylo do reakce přidáváno polovina výsledného objemu, primerů bylo dáno 0,3 pmol/ μl , v případě aditivních látek bylo nejčastěji dodáno 5% (v/v) DMSO (0,4 μl do 10 μl reakce, 1-2 μl do 25 μl reakce) a reakce byla doplněna vodou PCR Ultra H_2O , která je dodávána spolu s roztokem PPP Master Mix. Množství použité DNA o koncentraci 30-80 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ bylo různé, nejčastěji 0,5 μl do 10 μl reakce a 1-2 μl do 25 μl reakce.

Při optimalizaci PCR pro vyšetření transkriptu byly zkoušeny PCR reakce s použitím enzymů KlenTaq1 a DeepVent v jedné reakci. Kombinace těchto enzymů spojuje výkonnost KlenTaq1 polymerázy a korektorskou aktivitu DeepVent polymerázy. Pro 25 μl reakci bylo složení směsi: 2,50 μl pufru 10 \times PC2 (50 mM Tris HCl; 16 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2,5 mM MgCl_2), 2,50 μl 25 pmol/ μl směsi dNTPs, 2,00 μl 25 pmol/ μl MgCl_2 , 0,75 μl 10 pmol/ μl primerů, 0,13 μl enzymu KlenTaq1 25 000U/ml a 0,05 μl enzymu 20 \times DeepVent 2000 U/ml. Reakce byla do 23 μl doplněna PCR Ultra H_2O a bylo přidáno 2 μl cDNA.

V případě přípravy reakcí pro více vzorků byl nejdříve napipetován reakční mix – ten obsahoval všechny reagenty kromě primerů a DNA. Reakční mix byl promíchán na vortexu, krátce stočen a rozpipetován do předem označených mikrozkušavek. Poté byly přidány primery. Mimo box byla přidána genomová DNA nebo cDNA. V každé sérii PCR byl napipetován i slepý vzorek bez přidání DNA. Mikrozkušavky byly krátce centrifugovány a vloženy do vytemperovaného termocykleru DNA Engine® Thermal Cyclers (Bio-Rad). Teplotní profil PCR reakce byl použit buď již osvědčený, nebo musel být zoptimalizován. Vyhodnocení PCR reakce bylo provedeno horizontální agarózovou elektroforézou podle protokolu 4.4.5.

4.4.5 Horizontální gelová elektroforéza

Agarózová elektroforéza byla připravována podle zavedeného pracovního postupu Laboratoře nejčastěji 1%. Agaróza byla považena v 1 \times koncentrovaném Tris-borátovém pufru

(TBE pufr). Do 20 μ l 1% gelu bylo přidáno 0,5 μ l barvy 10000 \times GelRed, do 40 μ l 1 μ l barvy. Pokud nebylo barvivo přidáno do rozpuštěného gelu, tak bylo přidáno 20 \times naředěné až se vzorkem v poměru uvedeném níže. Gel byl nalit do plastové vany a byl do něj zasunut hřeben pro vytvoření jamek. Po ztuhnutí byl gel i s plastovou vanou přenesen do elektroforetické vany a zalit 10 \times TBE a do jamek byly nanášeny vzorky.

PCR produkty s použitím roztoku PPP MasterMix byly nanášeny rovnou do jamek obarveného gelu nebo smíchány v poměru 5:4 s barvivem 20 \times GelRed a nanášeny na neobarvený gel. Ostatní vzorky byly namíchány v poměru 5:4:2 (vzorek:20 \times GelRed:nanášecí barva 6 \times DNA Loading Dye).

Ke vzorkům byl vždy do jedné jamky napipetován roztok obsahující 100bp DNA marker molekulových vah (ThermoFisher Scientific) smíchaný ze 4 μ l vody, 2 μ l markeru a 2 μ l nanášecí barvy 6 \times DNA Loading Dye.

Napětí potřebné pro elektroforetické dělení se odvíjelo od objemu a plochy gelu, většinou probíhalo při napětí 12 V/cm, pokud bylo potřeba, tak napětí bylo nižší. Dělení trvalo přibližně 30 minut, při víceprocentním gelu a/nebo sníženém napětí déle. Gel byl poté vyhodnocován na UV transiluminátoru a fotodokumentován.

4.4.6 Přechištění PCR produktu

Pro přechištění PCR produktu od neinkorporovaných nukleotidů a zbylých primerů bylo využito nejdříve sady Wizard SV Gel and PCR Clean-up System od firmy Promega a později sady Expin COMBO GP od firmy GeneAll. Tato změna byla zapříčiněna ekonomickou výhodností druhé sady. Obě sady umožňují přechištění PCR produktu jak hned po amplifikační reakci, tak i po vyříznutí z gelu. Protože přechišťování z gelu bylo prováděno až v době používání sady od firmy GeneAll, je tento postup uveden pouze u ní. Přechištění PCR produktu bylo prováděno podle zavedeného pracovního postupu Laboratoře.

4.4.6.1 Sada Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega)

PCR produkt byl doplněn vodou do objemu 100 μ l. K tomu bylo přidáno 100 μ l roztoku č.1 (Membrane Binding Solution – roztok pro vazbu na membránu) a promícháno na vortexu. Roztok byl přepipetován na kolonku dodávanou v sadě, umístěnou na označené zkumavce a inkubován při laboratorní teplotě 1 min. Kolonka se zkumavkou byla odstředěna 1 min při 14000 \times g. Eluát byl vylit a kolonka byla promyta 700 μ l roztoku č.2 (Membrane Wash Solution – roztok pro omytí membrány). Kolonka se zkumavkou byla odstředěna 1 min při 16000 \times g. Eluát byl vylit a kolonka byla promyta 500 μ l roztoku č. 2. Kolonka se zkumavkou

byla odstředěna 3 min při 16000×g. Eluát byl vylit a kolonka se zkumavkou byla odstředěna 3 min při 16000×g. Kolonka byla přenesena do čisté a předem označené zkumavky a ponechána 2 min při laboratorní teplotě pro odpaření zbytkového ethanolu. Pro eluci DNA z kolonky bylo na membránu napipetováno 35 µl vody zahřáté na 50 °C a inkubováno 1 min při laboratorní teplotě. Kolonka i se zkumavkou byla odstředěna 1 min při 16000×g. Po eluci byla kolonka vyhozena a zkumavka ponechána otevřená 4 min při 50 °C, aby se odpařil případný ethanol. Koncentrace byla změřena na spektrofotometru BioSpec-nano Micro-volume UV-Vis Spectrophotometer (Shimadzu) podle protokolu 4.4.7.1 a přečištěný PCR produkt byl uchováván v mrazáku.

4.4.6.2 *Sada Expin COMBO GP (GeneAll)*

4.4.6.2.1 Přečištění PCR produktu po amplifikační reakci

K jednomu dílu PCR produktu bylo přidáno 5 dílů roztoku Buffer PB a to bylo promícháno na vortexu. Roztok byl přepipetován na kolonku se zkumavkou dodané v sadě a kolonka se zkumavkou byla odstředěna 1 min při 13000×g. Eluát byl vylit a kolonka byla promyta 700 µl roztoku Buffer NW. Kolonka se zkumavkou byla odstředěna 1 min při 13000×g. Eluát byl vylit a kolonka se zkumavkou byla odstředěna na sucho 1 min při 13000×g. Kolonka byla přenesena do čisté a předem označené zkumavky a ponechána otevřená 2 min při laboratorní teplotě pro odpaření zbytkového ethanolu. Pro eluci DNA z kolonky bylo napipetováno na membránu 30 µl roztoku Buffer EB. Zkumavka s kolonkou byla inkubována 1 min při laboratorní teplotě, a poté byla odstředěna 1 min při 13000×g. Po eluci byla kolonka vyhozena a zkumavka ponechána otevřená 4 min při 50 °C, aby se odpařil případný ethanol. Koncentrace byla změřena na spektrofotometru BioSpec-nano Micro-volume UV-Vis Spectrophotometer (Shimadzu) podle protokolu 4.4.7.1 a přečištěný PCR produkt byl uchováván v mrazáku.

4.4.6.2.2 Přečištění PCR produktu z agarózového gelu

Proužek o požadované délce byl vyříznut z gelu a zvážen. Na 100 mg gelu bylo přidáno 300 µl roztoku Buffer GB. Vzorek byl inkubován 5 - 10 min v termobloku při teplotě 50 °C. V průběhu rozpouštění byla zkumavka s roztokem několikrát promíchána na vortexu. Po rozpouštění byl roztok přepipetován na kolonku ve zkumavce dodávané v sadě. Kolonka se zkumavkou byla odstředěna 1 min při 13000×g. Eluát byl vylit a kolonka byla promyta 700 µl roztoku Buffer NW. Kolonka se zkumavkou byla odstředěna 30 s při 13000×g. Eluát byl vylit a kolonka se zkumavkou byla odstředěna na sucho 1 min při 13000×g. Kolonka byla přenesena do čisté a předem označené zkumavky a nechána 2 min otevřená při laboratorní teplotě pro od-

paření zbytkového ethanolu. Pro eluci DNA z extrakční kolonky bylo na membránu napipetováno 30 µl roztoku Buffer EB. Zkumavka s kolonkou byla inkubována 1 min při laboratorní teplotě, a poté byla odstředěna 1 min při 13000×g. Po eluci byla kolonka vyhozena a zkumavka ponechána otevřená 4 min při 50 °C, aby se odpařil případný ethanol. Koncentrace byla změřena na spektrofotometru BioSpec-nano Micro-volume UV-Vis Spectrophotometer (Shimadzu) podle protokolu 4.4.7.1 a přečištěný PCR produkt byl uchováván v mrazáku.

4.4.7 Měření koncentrace DNA a RNA a ověření jejich čistoty

Pro měření koncentrace DNA i RNA a ověřování jejich čistoty byl použit spektrofotometr BioSpec-nano Micro-volume UV-Vis Spectrophotometer vyráběný firmou Shimadzu. Při potřebě velmi přesného určení koncentrace DNA byl použit fluorometr Qubit® 2.0 Fluorimeter vyráběný firmou ThermoFisher Scientific.

4.4.7.1 Spektrofotometr BioSpec-nano Micro-volume UV-Vis Spectrophotometer (Shimadzu)

Spektrofotometr byl použit podle návodu dodaného s přístrojem. Koncentrace byla stanovena měřením 1,5 µl vzorku při vlnové délce 260 nm a čistota měřené DNA byla určována podle poměru absorbancí při vlnových délkách 260/230 a 260/280 nm.

4.4.7.2 Fluorimetr Qubit® 2.0 Fluorometer (ThermoGisher Scientific)

Fluorimetr Qubit® 2.0 byl použit při pokusu qPCR, kde bylo potřeba získat co nejpresnější informaci o vstupní koncentraci DNA. K tomuto účelu byl fluorimetr vybrán jako přesnější než spektrofotometr, protože využívá fluorescenční barvivo k určení koncentrace, a tím měří, při použití vhodné sady reagensií, pouze DNA a ne i volné nukleotidy, jednovláknové nukleové kyseliny a další znečišťující látky.

Pro měření byly použity reagensie ze sady Qubit® dsDNA HS Assay Kit a protokol byl použit doporučený k této sadě. Bylo potřeba změřit 8 vzorků, proto bylo připraveno 10 0,5ml označených zkumavek – pro dva standardy (o koncentraci 0,0 a 10,0 ng/µl) a 8 vzorků. Rozpuštěním 10 µl roztoku Qubit® Reagent v 1990 µl roztoku Qubit® Buffer byl připraven pracovní roztok. Do zkumavek určených pro standardy bylo napipetováno 190 µl připraveného pracovního roztoku. K tomu bylo přidáno 10 µl daného standardu a zkumavky byly promíchány na vortexu po dobu 2–3 s. Do zkumavek připravených pro vzorky bylo přidáno 199 µl připraveného pracovního roztoku a k tomu přidán 1 µl vzorku. Zkumavky byly promíchány 2–3 s na vortexu. Všechny zkumavky byly poté inkubovány 2 min v pokojové teplotě, a poté byly změřeny podle návodu k přístroji.

4.4.8 Kvantitativní PCR v reálném čase

4.4.8.1 Kontrola primerů pomocí PCR

Před samotnou kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR) byla zkontrolována funkčnost navržených primerů. Primery byly naředěny na koncentraci 10 pmol/μl a byla provedena PCR podle protokolu 4.4.4. Reakce v objemu 10 μl obsahovala 5 μl PPP Master Mixu, 0,75 μl páru primerů (o koncentraci 10 pmol/μl), 3,25 μl vody a 1 μl DNA. Reakce proběhla v podmínkách:

Teplota [°C]	Čas	Opakování
95	2 min.	1×
95	15 s	35×
60	15 s	
72	10 min	
72	3 min	1×
15	nekonečno	1×

Funkčnost primerů byla zkontrolována na horizontální 2,5% agarózové elektroforéze v TBE gelu podle protokolu 4.4.5.

4.4.8.2 Kvantitativní PCR v reálném čase

Kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR) byla provedena podle protokolu vědeckých pracovníků ÚDMP. Metoda byla prováděna nejdříve v duplikátech, později v triplikátech na 384jamkové destičce v objemech 10 μl. Při každém experimentu byly použity dvě referenční DNA kontroly – *ALB* (gen kódující albumin), a *RPP30* (gen kódující podjednotku p30 ribonukleázy P). V jednom pokusu byla místo sondy pro gen *RPP30* použita sonda pro gen *LAMP2*, který kóduje lysosomální membránový protein 2. Každý vzorek byl normalizován podle jejich výsledných hodnot Ct.

Primery byly po navržení, dodání a zkontrolování funkčnosti naředěny ze zásobní koncentrace na pracovní koncentraci 20 pmol/μl. Vzorky DNA byly naředěny na koncentraci 3,75 ng/μl a rozpipetovány do mikrozkušavek pro přidávání multikanálovou pipetou. UPL (Universal Probe Library) sondy byly ze zásobní koncentrace 1 μM naředěny 10×. Reakční mix pro jednu jamku se skládal z 5 μl roztoku LightCycler® 480 Probes Master, který obsahoval FastStart Taq DNA Polymerázu, 0,8 μl sondy UPL 10×, 0,15 μl 20 μM dvojice primerů a doplněn do 6 μl PCR Ultra H₂O. Reakční mix byl připraven pro každý exon zvlášť. Reakční mix

byl napipetován na destičku a byla přidána DNA v množství 4 µl na jamku. Pro každý exon byl připraven také slepý vzorek, kam bylo místo 4 µl DNA napipetováno 4 µl PCR H₂O.

Pro vytvoření standardní křivky a zjištění efektivity reakce byla pro každý pár primerů napipetována ředící řada v duplikátech. Opět byl připraven reakční mix v přebytku pro jednu jamku a byl napipetován po 4 µl do jamek. Poté byla přidána naředěná DNA 10×, 1×, 0,1× a 0,01×.

Reakce qPCR proběhla v přístroji LightCycler 480 od firmy Roche v Ústavu molekulární genetiky Akademie věd v Praze. Teplotní profil qPCR reakce byl:

Teplota [°C]	Čas	Opakování
95	10 min	1×
95	15 s	40×
60	60 s	
72	1 s	
40	10 s	1×

Data z qPCR byla analyzována v programu LightCycler® 480 SW 1.5 a hodnoty Ct byly zaneseny do protokolu připraveného v programu Microsoft Excel, kde byl pomocí metody $\Delta\Delta C_t$ určen počet kopií daného úseku genu. Hodnoty Ct ředící řady byly vyneseny na semilogaritmický graf a z regresní křivky byla určena efektivita reakce.

4.4.9 Restrikční reakce

Pro ověření, zda metodou qPCR je možné rozpoznat delecí úseku genu, byl navrhnut experiment, při kterém byl pomocí restrikčního enzymu připraven arteficiální deletovaný vzorek.

Výběr restrikčních enzymů

Vybraný restrikční enzym musel splňovat tyto podmínky:

- jeho restrikční místo se musí nacházet v sekvenci alespoň jednoho úseku ohraničeného primery navrženými pro qPCR, a zároveň ohraničeného primery navrženými pro PCR

- nesmí štěpit alespoň v jednom úseku ohraničeného primery navrženými pro qPCR, aby existovala možnost kontroly
- jeho restriční místo musí obsahovat polymorfismus, díky kterému by existovala jak varianta sekvence, kdy enzym štěpí, tak naopak kdy neštěpí
- nesmí štěpit v sekvencích ohraničených primery pro referenční geny použité v qPCR reakci

Výhodou vybraného enzymu by byla existence DNA pacienta s homozygotní variantou sekvence, ve které enzym štěpí, a DNA pacienta s homozygotní variantou sekvence, ve které enzym neštěpí, aby existovala možnost kontroly funkčnosti a efektivity restričního enzymu.

Podle těchto kritérií byly pomocí programu The Sequence Manipulation Suite (Stothard, 2000) vybrány dva restriční enzymy, enzym *ApaI* a *BclI*. Enzym *ApaI* rozpoznává sekvenci GGGCC/C a enzym *BclI* sekvenci T/GATCA. Lomítky jsou naznačená místa štěpení.

4.4.9.1 Zkouška štěpení PCR produktu restričními enzymy *ApaI* a *BclI*

Zkouška funkčnosti restričních enzymů byla provedena pro enzymy *ApaI* (New England BioLabs) a *BclI* (Fermentas). Pro zkoušku enzymu *ApaI* bylo využito jednonukleotidového polymorfismu c.3058G>C vyskytujícího se v 19. exonu genu *NOTCH3*. Tento polymorfismus mění sekvenci GGGGCC na GGGCCC, a tím vzniká restriční místo pro enzym *ApaI*. Pro zkoušku funkčnosti enzymu byla proto použita DNA pacienta heterozygotního pro tento polymorfismus a jako kontroly byla využita DNA pacienta homozygotního pro sekvenci, ve které enzym neštěpí. DNA pacienta s homozygotní variantou, ve které by enzym štěpil, nebyla dostupná.

Enzym *BclI* štěpí v sekvenci T/GATCA. V 16. exonu genu *NOTCH3* se vyskytuje jednonukleotidový polymorfismus c.2538C>T, díky kterému se ze sekvence CGATCA stává sekvence TGATCA, a tím vzniká restriční místo rozpoznávané enzymem *BclI*. Pro zkoušku funkčnosti enzymu *BclI* byla použita DNA pacienta s homozygotní variantou sekvence, ve které enzym štěpí, a jako kontrolní byla použita DNA pacienta s homozygotní variantou sekvence, ve které enzym neštěpí.

Nejdříve byla provedena PCR reakce v objemu 25 µl, pro každého pacienta dvakrát a jeden slepý vzorek, tedy 9 reakcí. PCR reakce proběhla podle protokolu uvedeného v kapitole 4.4.4. Reakční mix obsahoval 125 µl PPP Master Mix a 107,50 µl vody. Byl použit pár primerů pro daný exon genu *NOTCH3* naředěný na koncentraci 10 pmol/µl v objemu 0,75 µl do každé zkumavky. Mimo box byl do každé zkumavky přidán 1 µl DNA. PCR proběhla za podmínek:

Teplota [°C]	Čas	Opakování
95	2 min	1×
95	15 s	35×
62	15 s	
70	40 s	
70	5 min	1×
15	nekonečno	1×

Úspěšnost PCR reakce byla ověřena na horizontální gelové elektroforéze na 1% TBE agarózovém gelu. Zbytek PCR produktu byl přečištěn podle protokolu 4.4.6.2.1 sadou Expin COMBO a eluován do 35 µl vody. Dvojice přečištěných PCR produktů z jedné DNA byly smíchány k sobě a změřena jejich koncentrace na spektrofotometru BioSpec-nano Micro-volume UV-Vis Spectrophotometer (Shimadzu) podle protokolu 4.4.7.1.

Podle výsledné koncentrace byly připraveny restriční reakce v 50 µl podle zavedeného pracovního postupu Laboratoře:

Pro enzym ApaI:

Do předem označené mikrozkušavky bylo přidáno 0,4 µg přečištěného PCR produktu pro exon 19, 5 µl roztoku 10× CutSmart Buffer, 1 µl enzymu ApaI (10000 U/ml) a reakce byla do 50 µl doplněna vodou. Byla promíchána špičkou pipety a krátce stočena. Poté byla vložena do termocycleru DNA Engine® Thermal Cyclers (Bio-Rad) a byla inkubována 16 hod ve 25 °C. Poté proběhla teplotní inaktivace podle doporučení výrobce enzymu, tedy 20 min v 65 °C.

Pro enzym BclI:

Do předem označené mikrozkušavky bylo přidáno 0,3 µg přečištěného PCR produktu pro exon 16, 5 µl roztoku 10× Buffer G, 2 µl enzymu BclI (3000 U/ml). Reakce byla do 50 µl doplněna vodou. Byla promíchána špičkou pipety a krátce stočena. Poté byla vložena do termocycleru DNA Engine® Thermal Cyclers (Bio-Rad) na 16 hod v 55 °C. Nakonec proběhla teplotní inaktivace podle doporučení výrobce enzymu, tedy 20 min v 80 °C.

Úspěšnost štěpení byla ověřena na horizontální 2,5% agarózové TBE elektroforéze podle protokolu 4.4.5.

4.4.9.2 Optimalizovaný protokol štěpení PCR produktu restrikčním enzymem BclI

Protože při reakci provedené podle předchozího protokolu 4.4.9.1 nebylo štěpení enzymem BclI úplné, bylo potřeba protokol optimalizovat.

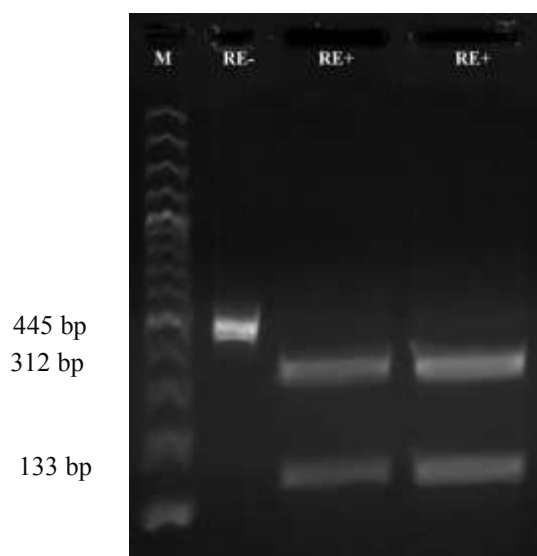
Byl připraven a přečištěn PCR produkt podle předchozího protokolu 4.4.9.1 pro enzym BclI s použitím stejné DNA.

Byl pozměněn protokol štěpení. Bylo upraveno jak množství vstupního PCR produktu, tak restrikčního enzymu a byl přidán mezikrok po 16hodinové inkubaci. Optimální množství vstupního PCR produktu bylo vyzkoušeno ve dvou pokusech:

A: 0,1 - 0,2 µg přečištěného PCR produktu pro exon 16

B: 0,2 - 0,4 µg přečištěného PCR produktu pro exon 16

Do předem označené mikrozkušavky bylo přidáno dané množství přečištěného PCR produktu pro exon 16, 5 µl roztoku 10× Buffer G, 3 µl enzymu BclI (3000 U/ml). Reakce byla do 50 µl doplněna vodou. Byla promíchána špičkou pipety a krátce stočena. Poté byla vložena do termocycleru DNA Engine® Thermal Cyclers (Bio-Rad) na 16 hod v 55 °C. Poté byl přidán 1 µl enzymu BclI (3000 U/ml) a mikrozkušavka byla opět vložena do termocycleru na 1 hod při 55 °C. Poté proběhla teplotní inaktivace podle doporučení výrobce enzymu, tedy 20 min v 80 °C. Úspěšnost štěpení byla ověřena na horizontální 2,5% agarózové TBE elektroforéze podle protokolu 4.4.5 (Obr. 12).



Obr. 12: Elektroferogram pro ověření štěpení restrikčním enzymem BclI. První produkt byl připraven bez přidání restrikčního enzymu (RE-), další dva s přidáním (RE+) k přečištěnému PCR produktu exonu 16 s použitím DNA s homozygtní variantou sekvence, ve které enzym štěpí. Ve třetí jamce je vzorek s přidáním 0,19 µg přečištěného PCR produktu, ve čtvrté jamce je 0,41 µg. M – 100bp marker molekulových vah. Množství PCR produktů vložených na gel bylo 10 µl RE- vzorku a 20 µl RE+ vzorků. Dáno na 2,5% TBE agarózový gel při 8 V/cm 45 min.

4.4.9.3 Štěpení DNA restrikčním enzymem BclI

Restrikční reakce probíhala v objemu 50 μ l. Pro enzym BclI bylo do mikrozkušavky přidáno 0,7 μ g DNA, 5 μ l 10 \times Buffer G, 3 μ l enzymu BclI (3000 U/ml). Reakce byla do 50 μ l doplněna vodou. Byla promíchána špičkou pipety a krátce stočena. Poté byla vložena do termocycleru na 16 hod v 55 °C. Poté byl přidán 1 μ l enzymu BclI (3000 U/ml) a mikrozkušavka byla opět vložena do termocycleru DNA Engine® Thermal Cyclers (Bio-Rad) na 1 hod při 55 °C. Poté proběhla teplotní inaktivace podle doporučení výrobce enzymu, tedy 20 min v 80 °C. Nakonec bylo provedeno srážení DNA ethanolem pro přečištění podle protokolu 4.4.10.1.

4.4.10 Srážení DNA ethanolem

Srážení DNA ethanolem bylo prováděno dvěma způsoby, jednou jako následný krok po restrikční reakci, kde bylo potřeba odstranit restrikční enzym i složky restrikčního pufru, aby neinhibovaly qPCR reakci, a podruhé jako předstupeň dialýzy v malém objemu určené ke zlepšení čistoty vstupní DNA do reakce qPCR. Při obou těchto srážení se protokol drobně lišil, proto jsou rozepsány do podkapitol.

4.4.10.1 Srážení DNA po restrikční reakci

Tento protokol odpovídá zavedenému pracovnímu postupu v Laboratoři. K 51 μ l restrikční reakce bylo přidáno 51 μ l 5M NH₄Ac a 204 μ l 100% (v/v) ledového EtOH. Zkušavka byla promíchána opakovaným převrácením. Poté byla umístěna do -80 °C přes noc. Druhý den byla zkušavka centrifugována 15000 \times g 30 min při 4 °C, supernatant byl odsán a peleta byla 2 \times promyta 75% (v/v) EtOH, opět centrifugována 15000 \times g 10 min při 4 °C, poté ponechána vysušit a rozpuštěna ve 30 μ l H₂O. Po 1 hod inkubace v pokojové teplotě s občasným promícháním na vortexu a krátkým stočením byla změřena koncentrace na spektrofotometru Bio-Spec-nano Micro-volume UV-Vis Spectrophotometer (Shimadzu) podle protokolu 4.4.7.1.

4.4.10.2 Srážení DNA před dialýzou v malém objemu

Protokol byl upraven podle (Moore and Dowhan, 2002) a zkušeností pracovníků laboratoře. Ke 100 μ l DNA bylo přidáno 100 μ l 3M AcNa a 300 μ l 96% (v/v) EtOH. Zkušavka byla na 45 min inkubována na směsi EtOH/CO₂(s). Poté byla 10 min centrifugována při 20000 \times g ve 4 °C. Supernatant byl odsán a byl přidán 70% (v/v) EtOH. Poté byla zkušavka centrifugována 10 min při 20000 \times g ve 4 °C. Supernatant byl odsán a bylo přidáno 100 μ l TE. Poté byla zkušavka 10 min inkubována při 37 °C. Následovala dialýza v malém objemu.

4.4.11 Dialýza v malém objemu (Drop Dialysis)

Pro pokus, jehož účelem bylo zjistit, jak čistá musí být vstupní DNA do qPCR reakce, bylo provedeno čištění dialýzou v malém objemu, které by mělo odstranit přebytečné soli a další kontaminanty. Protokol byl upraven podle doporučeného protokolu firmy New England Biolabs Inc. a zkušeností pracovníků Laboratoře.

Do kádinky bylo napipetováno 50 ml 10× TE. Na hladinu byla položena membrána Type-VS Millipore™ (průměrná velikost pórů = 0,025 μm) lesklou stranou nahoru, ukotvená na hladině pomocí parafilmu. Po 5 min, kdy už byla membrána lehce navlhčena, bylo na střed filtru napipetována malá kapka dané DNA, když se udržela na membráně, bylo dopipetováno zbytek do 50 μl vzorku. Celá kádinka se překryla, aby nedocházelo k odpařování. Dialýza probíhala přes noc a ráno byla DNA opatrně odpipetována do mikrozkušavky. Na střed membrány bylo pro opláchnutí napipetováno 50 μl 10× TE a přepipetováno do téže mikrozkušavky. Koncentrace přečištěné DNA byla změřena na spektrofotometru BioSpec-nano Micro-volume UV-Vis Spectrophotometer (Shimadzu) podle protokolu 4.4.7.1.

4.4.12 Sekvenování PCR produktů Sangerovou metodou

Příprava vzorků i materiálu na sekvenování i samotné sekvenování probíhalo podle zavedeného pracovního postupu Laboratoře. K sekvenační reakci byla použita sada Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Do destičky (MicroAmp 96 Well Reaction Plate) umístěné ve vymraženém bločku bylo multikanálovou pipetou postupně do všech jamek napipetováno na dno 1,9 ml reakční směsi, která byla po rozmražení stočena a která je dodávána v sadě. Na stěnu jamek bylo napipetováno 3 ml sekvenačního pufru ze sady. Pufry byly sklepany na dno jamky. Pak bylo pipetováno postupně po jedné řadě multikanálovou pipetou 15 μl připraveného PCR produktu. Řádně zavíčkovaná destička byla promíchána na vortexu. V případě, že na stěnách zůstaly kapičky, destička byla krátce stočena. Příprava sekvenační reakce v termocykleru DNA Engine® Thermal Cyclers (Bio-Rad) probíhala v teplotním profilu:

Teplota [°C]	Čas	Opakování
96	1 min	1×
96	10 s	25×
50	5 s	
60	4 min	
15	nekonečno	1×

Po dokončení sekvenační reakce v termocykleru byla destička stočena 2 min při 1000×g. Vzorky v destičce byly čištěny dvěma různými způsoby. Pokud byla zaplněna celá destička, byla použita sada CentriPure Dye Terminator od firmy Genaxxon Bioscience, pokud ne, tak sada BigDye XTerminator Purification Kit od firmy ThermoFisher Scientific.

A. Čištění sekvenační reakce pomocí sady CentriPure Dye Terminator - 96-well plates (Genaxxon Bioscience)

Tato sada obsahuje čisticí destičky. Čisticí destička byla před použitím 30 min temperována na laboratorní teplotu. Z čisticí destičky byla odstraněna spodní adhezivní fólie a byla umístěna na promývací destičku. Dohromady byly centrifugovány 4 min při 1500×g. Poté byla z čisticí destičky odstraněna horní adhezivní fólie a destička byla přemístěna na novou sekvenační destičku. Vzorky byly multikanálovou pipetou napipetovány do středu jamek čisticí destičky a byly centrifugovány 2 min 30 s při 1500×g. Destička byla překryta septem a umístěna do stojánku.

B. Čištění sekvenační reakce pomocí sady BigDye XTerminator® Purification Kit (ThermoFisher Scientific)

Sada obsahuje roztok XTerminator™ Solution a roztok SAM™. Na 20μl sekvenační reakci bylo použito celé množství (110 μl, tj. 90 μl SAM Solution + 20 μl BigDye XTerminator Solution) nebo poloviční množství sady (55 μl, tj. 45 μl SAM Solution + 10 μl BigDye XTerminator Solution) v závislosti na zkušenostech s výsledky čištění, tj. výskytu zbytkových barevných terminatorů (tzv. blobů) v elektroferogramu.

Do každé jamky v destičce bylo napipetováno 55 μl nebo 110 μl připraveného mixu ve zkumavce, která byla překlápěním a na vortexu promíchána vždy po napipetování 4 jamek. Destička byla překryta samolepicí fólií, která byla důkladně přimáčknuta (gumovým válečkem a následně obrácenou kolíbkou). Destička byla promíchána na vortexu v normální poloze, poté byla obrátit dnem vzhůru a vzorky byly sklepnuty, pro ujištění, že fólie těsní. Obrácená destička byla promíchána na vortexu po dobu 30 min. Před umístěním destičky do sekvenátoru byla destička v normální poloze opět sklepnuta, aby na fólii nezůstal přichycený XTerminator a stočena 2 min při 1000×g. Samolepicí fólie byla opatrně sejmuta a destička byla překryta septem a umístěna do stojánku.

Destička byla vložena do sekvenátoru ABI 3500xL (Applied Biosystems). Spuštění a obsluha sekvenátoru byla provedena podle uživatelské příručky Genetické analyzátorů 3500/3500xL dodávané s přístrojem. Analýza výsledků byla prováděna v programu Sequencing Analysis v6 (Applied Biosystems) a následně v programu CodonCode (CodonCode Corporation).

4.4.13 MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Amplification)

Příprava vzorků i materiálu na metodu MLPA prováděnou sadou SALSA MLPA probemix P071-A1 Leukodystrophy- LMNB1, PLP1, NOTCH3 (MRC-Holland) probíhala podle zavedeného pracovního postupu Laboratoře. Vzorky byly naředěny tak, aby do reakce bylo vloženo 100 ng DNA a vzorek byl doplněn pufrém TE do 5 μ l. K 1-7 vzorkům byly použity 2-3 referenční vzorky, tedy takové vzorky, u kterých je předpokládán normální počet kopií. Na jednu sérii vzorků byl vždy připraven i jeden slepý vzorek bez přidání DNA, tedy obsahující pouze 5 μ l pufru TE.

Mikrozkumavky se vzorky byly vloženy do termocykleru DNA Engine® Thermal Cyclers (Bio-Rad). Vzorky byly denaturovány při teplotě 98 °C po dobu 5 min, následně byly ochlazeny na teplotu 25 °C. V tomto kroku byly zkumavky vyndány z termocykleru a v laminárním boxu byl ke každému vzorku napipetován hybridizační mix připravený z 1,5 μ l pufru MLPA a 1,5 μ l roztoku MLPA probemix. Vzorky byly promíchány pipetováním. Vzorky byly vloženy zpět do termocykleru a byly inkubovány 1 min při 95 °C a následně 17 hodin při 60 °C.

Poté byl v laminárním boxu připraven ligační mix. Pro každou reakci bylo smícháno 25 μ l vody PCR Ultra H₂O s 3 μ l pufru Ligase buffer A a 3 μ l pufru Ligase buffer B. K tomu bylo přidáno z mrazícího bločku 1 μ l enzymu Ligase-65. Směs byla promíchána pipetováním. Vzorky z termocykleru byly ochlazeny na 54 °C, poté byl program přerušen a ke vzorkům bylo přidáno 32 μ l ligačního mixu a vzorky byly promíchány pipetováním. Poté v termocykleru proběhla ligační reakce: 54 °C po dobu 15 minut, 98 °C po dobu 5 minut a zchlazení na 20 °C.

Následovala PCR reakce připravená v laminárním boxu. PCR mix byl připraven pro jeden vzorek ze 7,5 μ l vody PCR Ultra H₂O + 2 μ l SALSA primer mix + 0,5 μ l SALSA polymerázy. Směs byla promíchána pipetováním a uchovávána na ledu. Při laboratorní teplotě byl mix přidán ke vzorkům, vzorky byly promíchány pipetováním a následně vloženy do termocykleru.

PCR reakce proběhla za podmínek:

Teplota [°C]	Čas	Opakování
95	30s	35×
60	30 s	
72	60 s	
72	20 min	1×
15	nekonečno	1×

Pro fragmentační analýzu byly vzorky připraveny ve třech koncentracích:

0,5 µl vzorku + 9,2 µl Hi-Di Formamid + 0,3 µl velikostního standardu (ROX)

0,7 µl vzorku + 9,0 µl Hi-Di Formamid + 0,3 µl velikostního standardu (ROX)

0,9 µl vzorku + 8,8 µl Hi-Di Formamid + 0,3 µl velikostního standardu (ROX)

Poté byly v termocykleru vzorky denaturovány při 80 °C 2 minuty, poté zchlazeny na 15 °C. Takto připravené vzorky byly přepipetovány do sekvenační destičky, stočeny 2 min při 1000×g a fragmentační analýza proběhla na kapilárním sekvenátoru ABI 3500xL (Applied Biosystems). Spuštění a obsluha sekvenátoru byla provedena podle uživatelské příručky Genetické analyzátorů 3500/3500xL dodávané s přístrojem. Vyhodnocení dat proběhlo pomocí softwaru Coffalyser.NET (MRC-Holland).

5 Výsledky

5.1 Analýza transkriptu genu *NOTCH3*

5.1.1 Optimalizace analýzy transkriptu genu *NOTCH3*

Prvním krokem analýzy transkriptu byla optimalizace PCR reakce pro namnožení úseků cDNA k sekvenování PCR produktů Sangerovou metodou. Primery byly navrženy tak, aby se vznikající PCR produkty překrývaly a pokrývaly prvních 23 exonů genu *NOTCH3*, které kódují extracelulární doménu vznikajícího proteinu (Příloha 1).

První PCR reakce proběhla za podmínek doporučených výrobcem používaného roztoku PPP Master mix (Tab. 6) a teplotou tání daných primerů (Tab. 7). Výtěžnost PCR reakce byla ale podle výsledného elektroferogramu (Obr. 13) u většiny produktů nízká a u některých produktů se objevovaly nespecifické produkty. Proto byla provedena optimalizace teplotního profilu reakcí, množství aditiv a vložené cDNA.

Tab. 6. Množství použitých reagensů v první reakci PCR.

Reagencie	[μ l]
PPP Master Mix	12,50
DMSO	1,00
Primery: S-AS 10 pmol/ μ l	0,75
Voda do 25 μ l	8,75
cDNA	2
Celkem	25

Tab. 7. Teplotní profily reakcí pro dané fragmenty v první reakci PCR.

Pro fragmenty 1, 2, 3, 5, 6, 8, 9

Teplota [$^{\circ}$ C]	Čas	Opakování
95	2 min	1 \times
95	15 s	35 \times
58-60	15 s	
70	50 s	
70	5 min	1 \times
15	neko- nečno	1 \times

Pro fragment 4

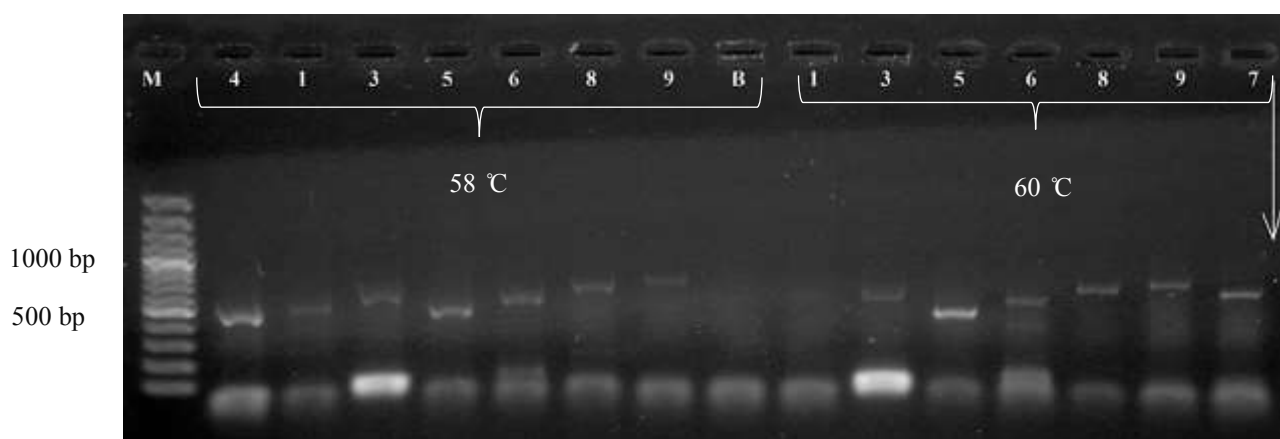
Teplota [$^{\circ}$ C]	Čas	Opakování
95	2 min	1 \times
95	15 s	35 \times
56	15 s	
70	50 s	
70	5 min	1 \times
15	neko- nečno	1 \times

Pro fragment 7

Teplota [$^{\circ}$ C]	Čas	Opakování
95	2 min	1 \times
95	15 s	35 \times
56	15 s	
70	50 s	
70	5 min	1 \times
15	neko- nečno	1 \times

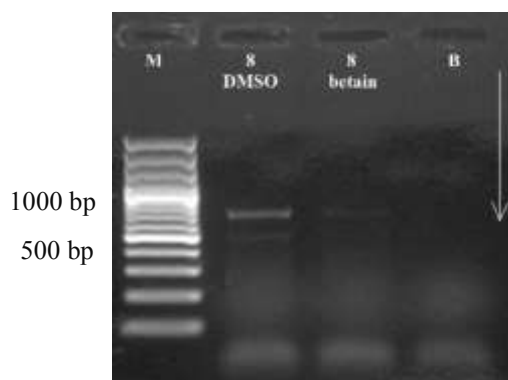
Tab. 8. Předpokládané délky PCR produktů

Název produktu	Délka produktu
Fragment 1	529 bp
Fragment 3	707 bp
Fragment 4	509 bp
Fragment 5	493 bp
Fragment 6	612 bp
Fragment 7	681 bp
Fragment 8	716 bp
Fragment 9	775 bp



Obr. 13. První PCR reakce fragmentů 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ve dvou různých teplotách. Elektroforéza proběhla v 1% TBE agarózovém gelu při 12 V/cm 30 min. Délka fragmentů je uvedena v Tab. 8. M – 100bp marker molekulových vah, B – slepý vzorek, šipka ukazuje směr putování vzorků. Množství PCR produktů vložených na gel bylo 5 μ l.

Nejdříve byl proveden test aditiv. Na fragmentu 8 bylo vyzkoušeno kromě přidání DMSO do jedné reakce (Tab. 6) a 5M roztoku betainu (5 μ l), jako druhého možného aditiva. Z výsledného elektroferogramu (Obr. 14), kde v dráze s DMSO byl vidět silnější pruh, bylo určeno, že se i nadále bude přidávat právě DMSO.



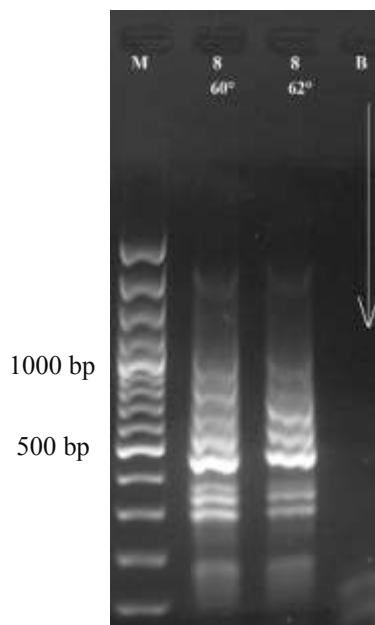
Obr. 14. Testování aditiv DMSO a betain. M – 100bp marker molekulových vah. Množství PCR produktů vložených na gel bylo 5 μ l. Elektroforéza probíhala v 1% TBE agarózovém gelu při 12 V/cm 30 min. Šipka ukazuje směr putování vzorků

V rámci testování aditiv byl zjišťován vliv přidání hořečnatých iontů do reakce namnožení fragmentu 8. K původním reagensům byl přidáván 25mM roztok hořečnatých kationtů. Do reakcí bylo přidáváno od 0 do 1,5 μ l tohoto roztoku. Dle výsledného elektroferogramu bylo určeno, že původní množství hořečnatých iontů již obsažených v roztoku PPP Master Mix je ideální.

Jelikož přidávání jiných aditiv nezlepšilo amplifikaci, byl roztok PPP Master Mix s polymerázou nahrazen kombinací polymeráz Klentaq1 25 000 U/ml a 1/20 DeepVent 2000 U/ml. Tato kombinace je robustnější, dokáže silně a s minimem chyb namnožit i delší fragmenty. Kombinace byla použita v reakci s primery pro fragment 8. Zároveň byl podle zkušeností s touto kombinací polymeráz pozměněn i teplotní profil reakce (Tab. 9). Z výsledného elektroferogramu (Obr. 15) lze vyčíst, že dochází k namnožení mnoha dalších úseků kromě požadovaného.

Tab. 9. Reagencie a teplotní profil pro reakce PCR s použitím kombinace polymeráz Klentaq1 a DeepVent.

Reagencie	[μ l]	Teplota [°C]	Čas	Opakování
PC2 10x	2,50	95	3 min	1×
dNTPs 2mmol/l	2,50	95	5 s	20×
25 mmol/l MgCl ₂	2,00	60-62	15 s	
primer: U+L 10 pmol/ μ l	0,75	68	50 s	
Klentaq1	0,13	95	5 s	15×
DeepVent 1/20	0,05	60-62	15 s	+ 10 s/cyk-lus
Voda do 25 μ l	15,07	68	50 s	
cDNA	2,00	68	10 min	1×
Celkem	25,00	15	nekonečno	1×



Obr. 15. PCR reakce fragmentu 8 s použitím kombinace DNA polymeráz Klentaq1 a DeepVent při teplotě nasední primerů 60 a 62 °C. M – 100bp marker molekulových vah. Množství PCR produktů vložených na gel bylo 5 μ l. Elektroforéza probíhala v 1% TBE agarózovém gelu při 12 V/cm 30 min. Šipka ukazuje směr putování vzorků.

Dalším krokem optimalizace bylo namnožit problematické fragmenty namnožením dlouhého úseku pokrývajícího oblast 2 fragmentů. Úseky byly ohraničeny kombinací primerů:

1U + 2L (939 bp)

2U + 3Lp (1 115 bp)

3Up + 4L (1 042 bp)

5U + 6L (823 bp)

8U + 9L (1 261 bp)

U značí horní primer, L dolní.

I v těchto kombinacích však došlo k namnožení nespecifických PCR produktů. Reakce proběhla za přidání stejného množství reagensů, avšak teplotní profil reakce se v rámci změny množených úseků pozměnil podle ideální teploty tání. Jelikož tedy tato kombinace polymeráz nezlepšila specifitu PCR reakcí, pozornost byla zaměřena hlavně na úpravy teplotních profilů reakcí s původním roztokem PPP Master Mix. Následuje popis optimalizovaných podmínek. Výsledný elektroferogram je na obr. 16.

Výsledné optimalizační podmínky:

Fragment 1a, 7n, 9

Reagencie	[μl]
PPP Master Mix	12,50
DMSO	2,00
Primery: S-AS 10pmol/ul	0,75
Voda do 25 ul	7,75
cDNA	2
Celkem	25

Fragment 1b, 2, 3pn, 3c, 4, 5, 6n, 8

Reagencie	[μl]
PPP Master Mix	12,50
DMSO	1,00
Primery: S-AS 10pmol/ul	0,75
Voda do 25 ul	8,75
cDNA	2
Celkem	25

Teplotní profil reakce pro fragment 1a:

Teplota [°C]	Čas	Opakování
95	1 min	1×
95	20 s	30×
64	20 s	
72	30 s	
95	15 s	10× + 5 s/cyklus
66	15 s	
72	30 s	
72	7 min	1×
15	nekonečno	1×

Pro fragment 4:

Teplota [°C]	Čas	Opakování
94	1 min	1×
94	20 s	30×
56	20 s	
72	30 s	
94	15 s	10× + 5 s/cyklus
58	15 s	
72	30 s	
72	7 min	1×
15	nekonečno	1×

Pro fragment 6n, 8:

Teplota [°C]	Čas	Opakování
94	1 min	1×
94	20 s	30×
64	20 s	
72	30 s	
94	15 s	10× + 5 s/cyklus
64	15 s	
72	30 s	
72	7 min	1×
15	nekonečno	1×

Pro fragment 2, 5, 9:

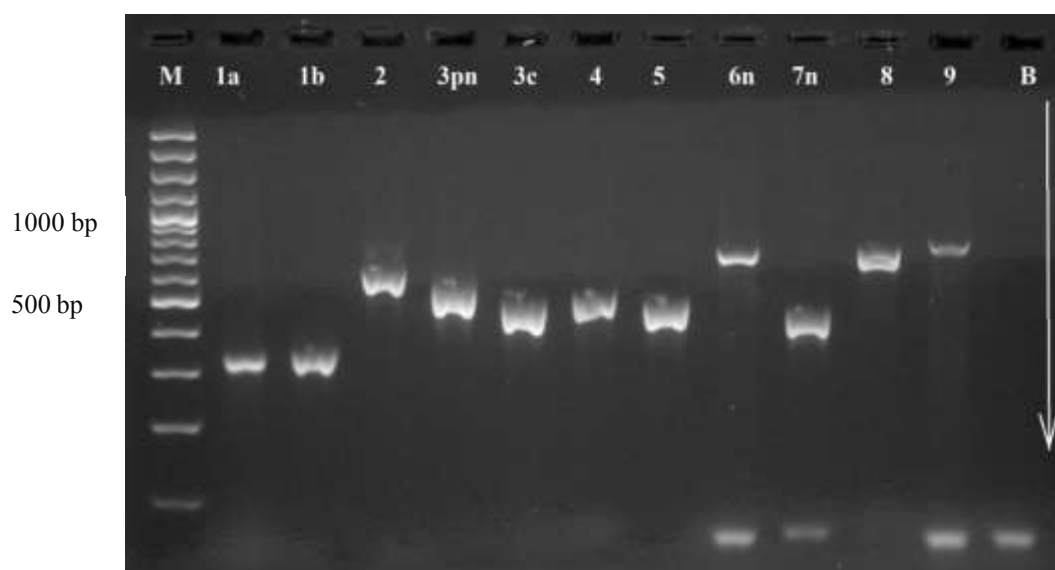
Teplota [°C]	Čas	Opakování
94	1 min	1×
94	20 s	30×
60	20 s	
72	30 s	
94	15 s	10× + 5 s/cyklus
62	15 s	
72	30 s	
72	7 min	1×
15	nekonečno	1×

Pro fragmenty 1b, 3pn, 3c:

Teplota [°C]	Čas	Opakování
94	1 min	1×
94	20 s	30×
62	20 s	
72	30 s	
94	15 s	10× + 5 s/cyklus
64	15 s	
72	30 s	
72	7 min	1×
15	nekonečno	1×

Pro fragment 7n:

Teplota [°C]	Čas	Opakování
94	1 min	1×
94	20 s	30×
62	20 s	
72	30 s	
94	15 s	10× + 5 s/cyklus
62	15 s	
72	30 s	
72	7 min	1×
15	nekonečno	1×

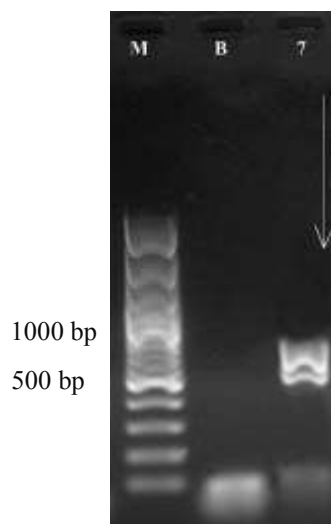


Obr. 16. Výsledný elektroferogram po optimalizaci. Množství PCR produktů vložených na gel: fragmenty 1b, 2, 3pn, 3c, 4, 5, 7n po 2 µl, fragment 8, marker molekulových vah a slepý vzorek (B) po 5 µl, fragment 6n po 9 µl a fragmenty 1a a 9 po 10 µl. Podle intenzity jednotlivých pruhů PCR produktů bylo odvozeno množství PCR produktů pro sekvenační reakci. Elektroforéza byla provedena v 1,5% TBE agarózovém gelu při 10 V/cm 40 min. M – 100bp marker molekulových vah, šipka ukazuje směr putování vzorků.

5.1.2 Transkripční varianta X1 genu *NOTCH3*

Optimalizace fragmentů 6 a 7 s původně navrženými primery nebyla úspěšná, u každého z fragmentů se vždy na elektroferogramu vyskytovaly dva pruhy (Obr. 17). Proto byla směs PCR produktů po namnožení fragmentu 7 osekvenována. V sekvenci byly nalezeny dva produkty o přibližné délce 500 bp a 640 bp odpovídající dvěma transkripčním variantám. Zkrácený

produkt byl identifikován jako předpokládaná transkripční varianta X1. Pro účely hledání patogenních mutací v transkriptu byl proto navržen nový dolní primer ohraničující fragment 6 a nový horní primer ohraničující fragment 7 tak, aby zasahovaly právě do oblasti chybějící v X1 transkripční variantě, tedy do exonu 16. Takto novými primery ohraničené fragmenty byly označeny jako 6n a 7n (obr. 16).



Obr. 17. Elektroferogram s PCR produktem fragmentu 7. V dráze označené 7 jsou rozdělené dva produkty o přibližných délkách 500 bp a 640 bp, které odpovídají dvěma transkripčním variantám. Elektroforéza proběhla v 1% TBE agarózovém gelu při 12 V/cm 30 min. M – marker molekulových vah, B – blank, šipka ukazuje směr elektroforézy.

Reakce na obr. 17 proběhla za podmínek:

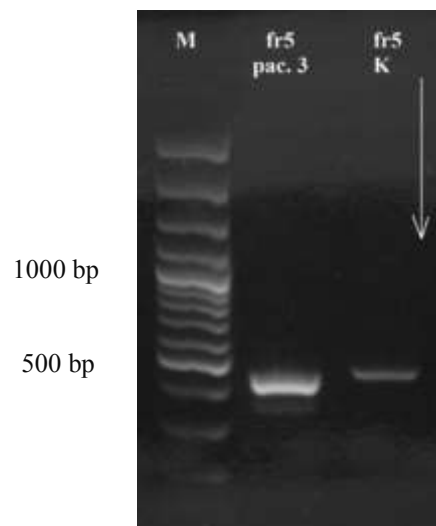
Reagencie	[μ l]	Teplota [°C]	Čas	Opakování
PPP Master Mix	12,50	94	1 min	1×
DMSO	1,00	94	20 s	30×
Primery: S-AS	0,75	62	20 s	
10pmol/ul	8,75	72	30 s	
Voda do 25 ul	2	94	15 s	10× + 5 s/cyklus
cDNA	25	62	15 s	
Celkem		72	30 s	
		72	7 min	1×
		15	nekonečno	1×

5.1.3 Výsledky analýzy transkriptu genu *NOTCH3* u pacientů

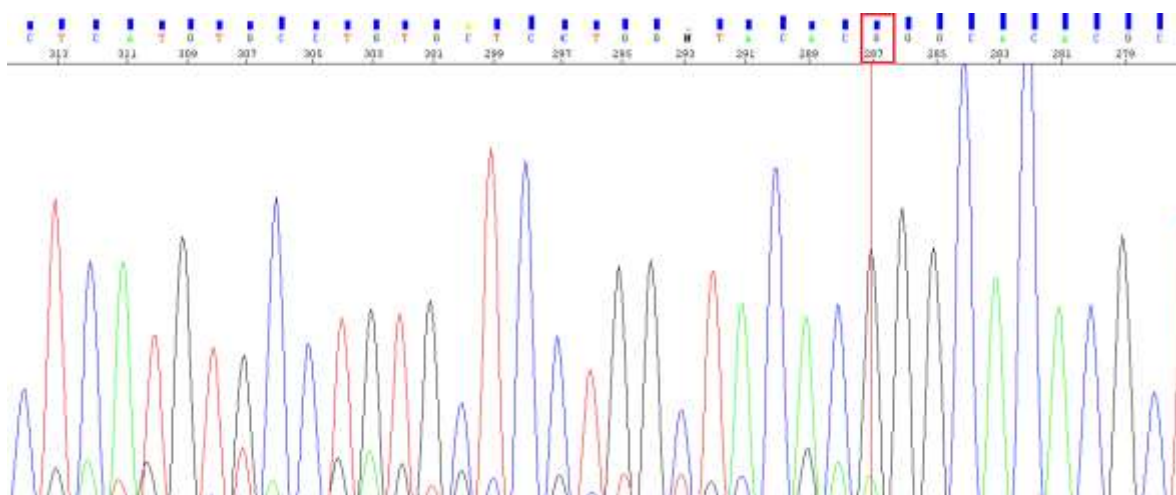
Celková analýza transkriptu s využitím všech 9 fragmentů byla provedena u dvou pacientů s variantami s neznámou patogenitou. U pacienta 1 byla Sangerovým sekvenováním PCR produktu z genomové DNA prokázána přítomnost varianty c.218G>A (p.G73V) a u pacientky 2 byl zjišťován vliv na transkript varianty c.1490C>T (p.S497L). Analýzou transkriptu byla ověřena heterozygotie pro r.218g>a u pacienta 1 a r.1490c>u u pacientky 2. U pacientky 16, která nese na úrovni genomové DNA variantu c.3601C>A (p.R1201S), byla vyšetřena jen příslušná část transkriptu, tedy fragment 9. Varianta r.3601c>a byla prokázána v heterozygotním stavu. Vyšetření transkriptu u těchto tří pacientů neprokázalo vliv sledovaných variant na sestřih ani stabilitu transkriptu.

U skupiny tří pacientů (3, 4 a 5) s variantou neznámé patogenity c.1725G>A (p.T575=) v exonu 11 byla provedena analýza transkriptu v oblasti fragmentů 4 a 5, zahrnujících exony 9, 10, 11, 12 a část exonu 13. Namnožením úseků ohraničených primery 4U + 4L (fr4), 4U + 5L (4U5L) a 5U + 5L (fr5), kde U značí horní primer a L dolní, byly na elektroferogramu nalezeny i pruhy o menší velikosti, než bylo očekáváno. Vyříznutím pruhů z gelu, přečištěním, reamplifikací a sekvenováním byla kromě nemutované alely transkriptu prokázána přítomnost i transkriptu s delecí r.1607_1726del120. Tato delece 120 bp způsobuje na proteinové úrovni deleci 40 aminokyselinových zbytků bez posunu čtecího rámce p.F537_G576del. Deletovaný úsek obsahuje 6 cysteinových zbytků - Cys542, Cys549, Cys554, Cys559, Cys568 a Cys570, které jsou podle katalogu UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9UM47>) párovány 533+542, 549+559, 554+568 a 570+579 disulfidovými můstky.

První PCR reakce pro namnožení fragmentů 4 a 5 byla provedena v podmínkách vycházejících z optimalizace. Fragment 4U5L (718 bp) byl namnožen za stejných podmínek jako fragment 5. Dva pruhy vzniklé amplifikací fragmentu 5 jsou ukázány na obr. 18, jejich sekvence na obr. 19.



Obr. 18. Dva pruhy značící dva různě dlouhé PCR produkty fragmentu 5 u pacienta 3 oproti kontrole (K). M – 100bp marker molekulových vah. Množství PCR produktů vložených na gel bylo 5 μ l. Elektroforéza probíhala v 1,5% TBE agarózovém gelu při 10 V/cm 40 min. Šipka ukazuje směr putování vzorků.



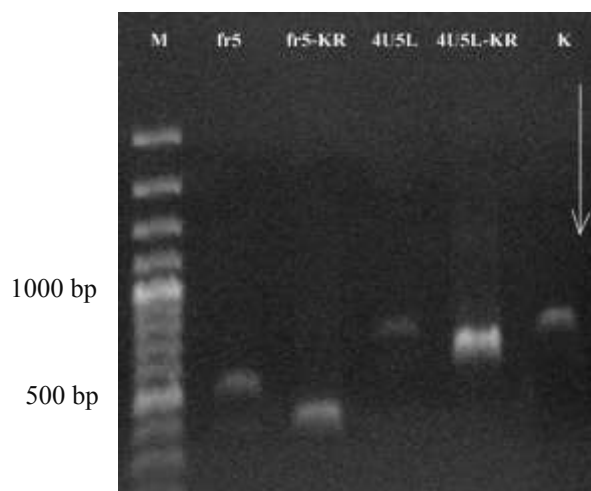
Obr. 19. Část sekvence fragmentu 5 před oddělením PCR produktů. Je patrná dvojitá sekvence od pozice 287G doleva (sekvenováno reverzním primerem), která odpovídá pozici v referenční sekvenci r.1725. Minoritní sekvence odpovídá aberantně sestřižené alele. Označena je heterozygotní varianta c.1725G>A.

PCR produkty byly přečištěny a kratší pruhy byly vyříznuty z gelu a přečištěny. Jelikož koncentrace přečištěných kratších produktů byla velmi nízká, byla provedena reamplifikace produktů.

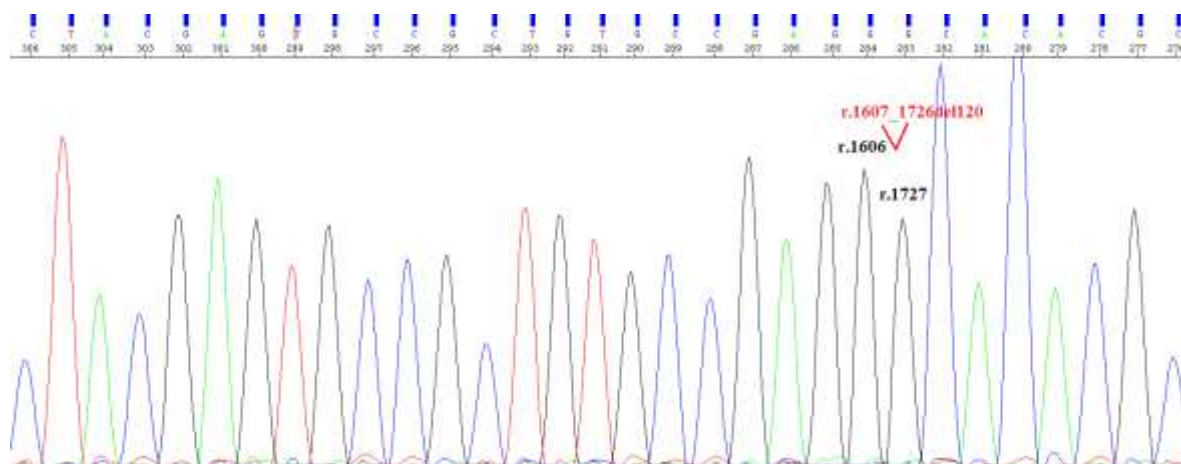
Reamplifikace probíhala v teplotním profilu odpovídajícímu daným fragmentům a s re-agenciemi:

Reagencie	[μ l]
PPP Master Mix	12,50
DMSO	1,00
Primery: S-AS 10 μ mol/ul	0,75
Voda do 25 ul	9,75
Přečištěný PCR produkt	1
Celkem	25

Vzorky po reamplifikaci byly opět přečištěny a na obr. 20 je možné vidět původní přečištěné produkty fr5 a 4U5L a po reamplifikaci přečištěné produkty fr5-KR a 4U5L-KR. Produkty byly osekvenovány (Obr. 21).



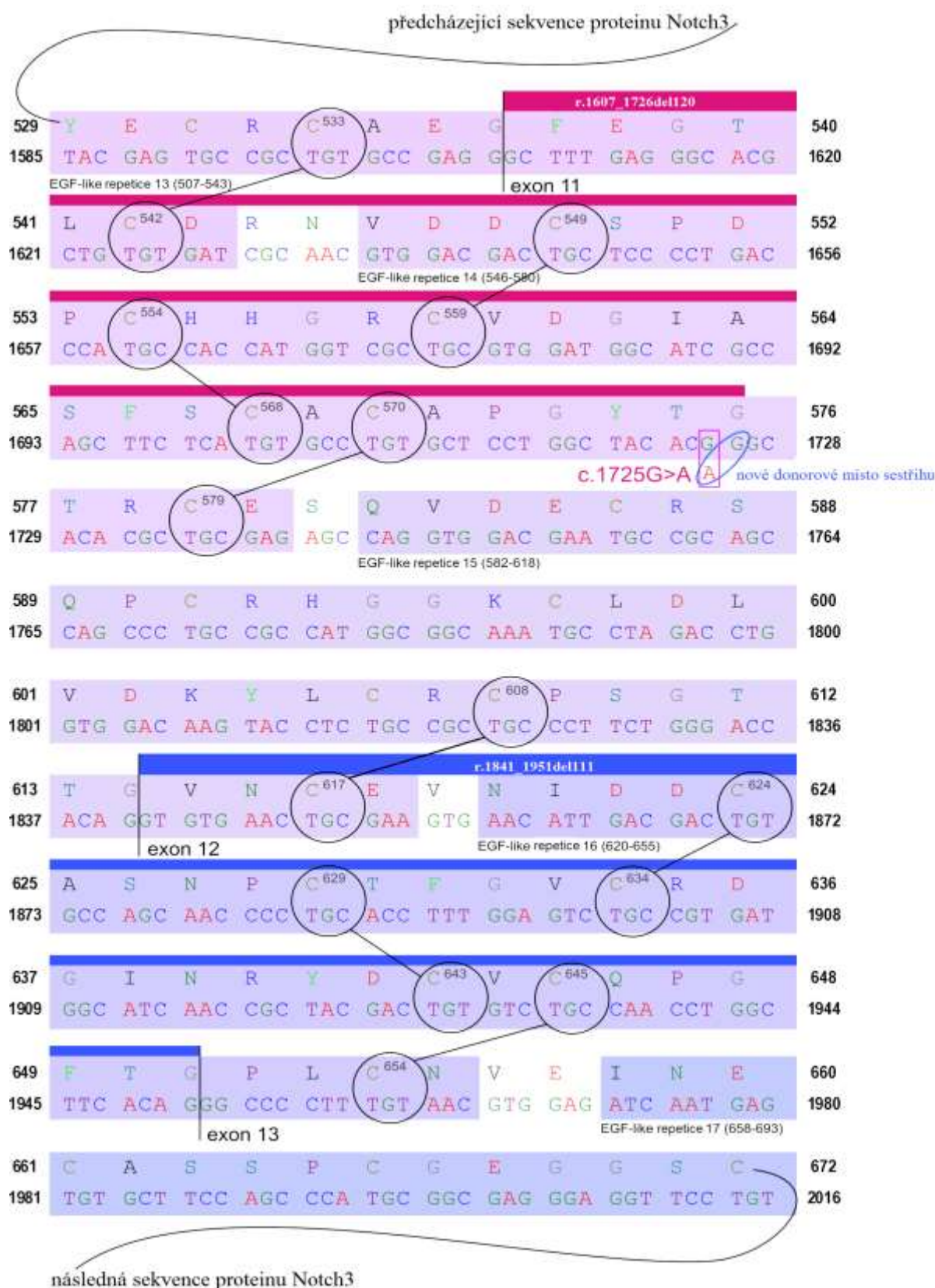
Obr. 20: Přečištěné PCR produkty fragmentů 5 a 4U5L pacienta 3 a vyříznuté z gelu a přečištěné kratší řetězce značené KR. M – 100bp marker molekulových vah. Množství PCR produktů vložených na gel bylo 5 μ l. Elektroforéza probíhala v 1,5% TBE agarózovém gelu při 10 V/cm 40 min. Šipka ukazuje směr putování vzorků.



Obr. 21. Sekvence izolovaného kratšího produktu s vyznačenou delecí r.1607_1726del120.

Minoritně byla také u pacienta 3 detekována sestřihová varianta, která kromě uvedené delece 120 bp obsahovala i delecí exonu 12 (r.1841_1951del111), která vede k delecí 37 aminokyselinových zbytků bez posunu čtecího rámce na úrovni proteinu p.F537_G579del. Tento výsledek potvrzuje *in silico* analýzu provedenou programem Mutation Taster (Schwarz et al., 2014), že varianta c.1725G>A ovlivňuje nasedací místo pro enhancer/silencer sestřihu exonu 12. Znázornění obou delecí v sekvenci transkriptu i proteinu Notch3 je na obr. 22.

Výsledky z analýzy transkriptu byly prezentovány ve formě posteru (Příloha 2) na konferenci European Society of Human Genetics (ESHG) v roce 2016 v Barceloně.

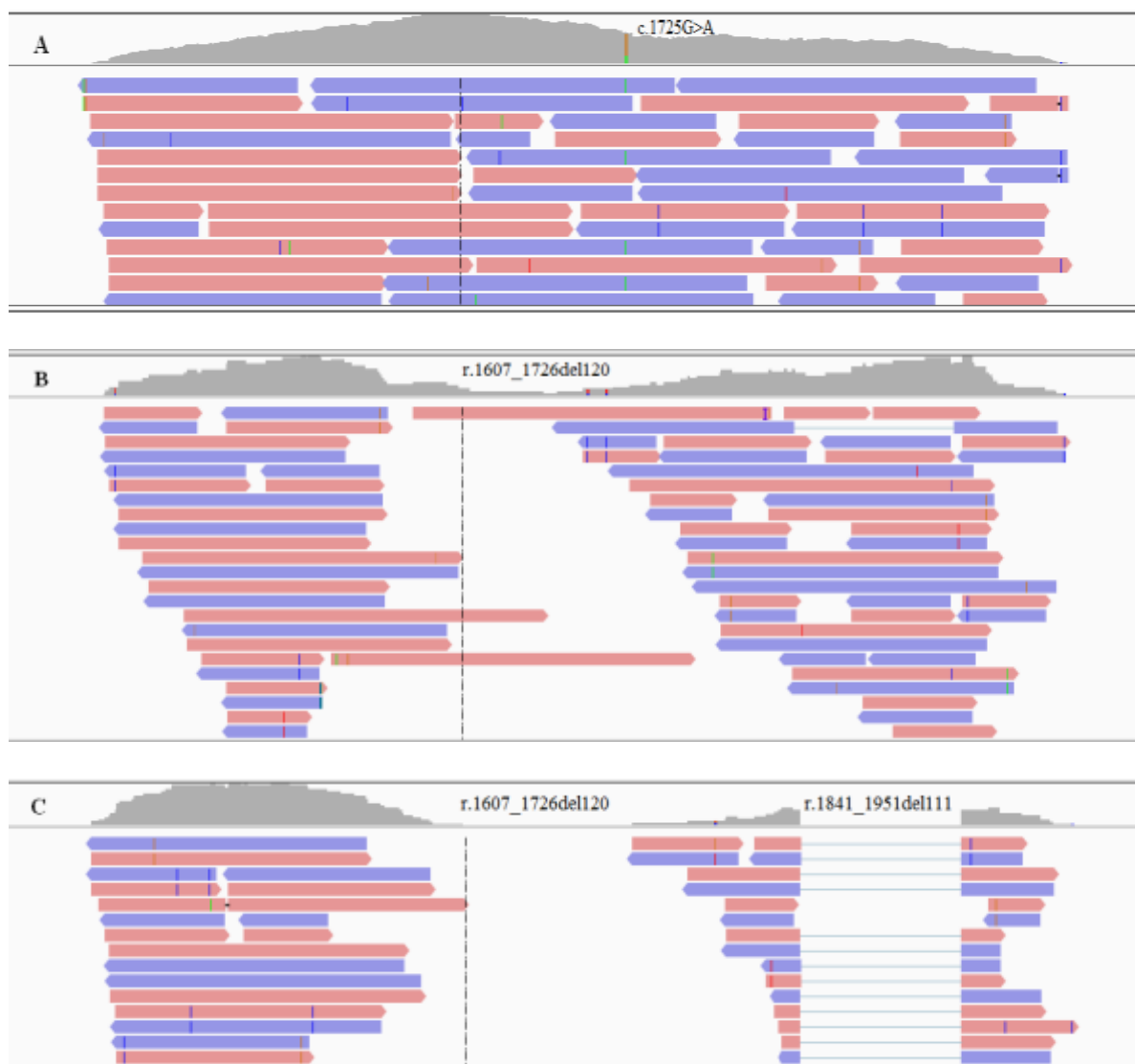


Obr. 22. Sekvence transkriptu a proteinu Notch3 pacienta 3. Růžovou barvou je označena delece r.1607_1726del120 (p.F537_G576del) a modře minoritní delece r.1841_1951del111 (p.V615_G651del). Disulfidické vazby mezi cysteinovými zbytky jsou označeny spojenými kruhy.

5.2 Potvrzení výsledků metodou NGS sekvenování

Výsledky analýzy transkriptu vzorku pacienta 3 byly ověřeny sekvenováním metodou nové generace (NGS) PCR produktů cDNA fragmentu 4-5. Přípravu i vyhodnocení dat provedl Mgr. Martin Řeboun z Laboratoře DNA diagnostiky ÚDMP. Příprava knihovny byla provedena podle standardního protokolu NexteraXT ([online], dostupné z: https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/samplepreps_nextera/nextera-xt/nextera-xt-library-prep-protocol-guide-1000000006564-00.pdf, [cit. 2017-03-27]). Sekvenování proběhlo na přístroji Miseq (Illumina) sekvenačním kitem MiSeq Reagent Kit v2 (500 cycle) MS-102-2003. Analýza proběhla na demultiplexovaných FASTQ souborech generovaných sekvenátorem (program Miseq Reporter 2.6). V prvním kroku byla kvalita dat analyzována programem FASTQC a očištěna pomocí nástroje Trimmomatic. Aligment na referenční sekvenci byl proveden pomocí nástroje Tophat2 (Kim et al.). Při mapování na genomovou sekvenci byla jako referenční sekvence použita hg19 a při mapování na transkript genu *NOTCH3* sekvence NM 000435.2. Duplicity čtení byly odstraněny pomocí nástroje Picard tools.

Výsledky potvrdily v PCR produktech pacienta 3 přítomnost varianty c.1725G>A v heterozygotním stavu. 32 % čtení obsahovalo v tomto lokusu alelu A, 68 % alelu G. Dále byla potvrzena přítomnost obou delecí: r.1607_1726del120 a r.1841_1951del111 (Obr. 23). Sekvenování těchto PCR produktů však proběhlo pouze s nízkým počtem čtení (0-139 čtení transkriptu s heterozygotní záměnou, 0-27 čtení transkriptu s delecí r.1607_1726del120, 0-37 čtení transkriptu s oběma delecemi).



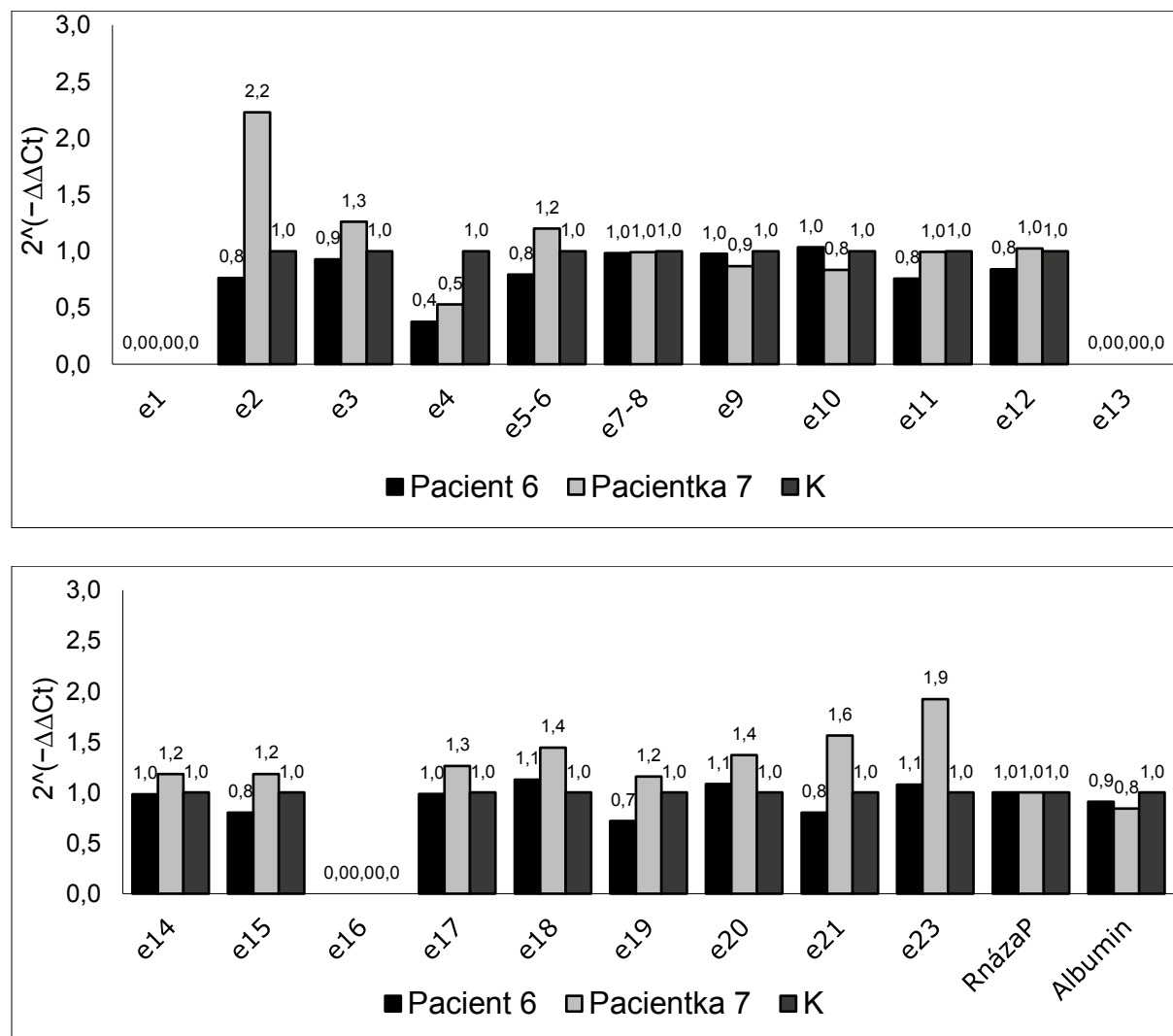
Obr. 23. Výsledky sekvenování NGS vzorků pacienta 3. Čtecí rámce jsou vztaženy k referenční sekvenci cDNA NM 000435.2. Šedé oblasti v horních částech jednotlivých obrázků udávají relativní množství čtení v rámci daného transkriptu. A) Transkript s heterozygotní záměnou c.1725G>A bez delecí. B) Transkript s delecí r.1607_1726del120. C) Transkript s delecí r.1607_1726del120 a r.1841_1951del111.

5.3 Výsledky metody kvantitativní PCR v reálném čase

Rozmezí hodnot $\Delta\Delta C_t$ pro určení změny genové dávky bylo stanoveno před jednotlivými pokusy qPCR podle zkušeností pracovníků ÚDMP, především Ing. Filipa Majera, Ph.D., kteří se metodě qPCR věnovali. Pro vzorky beze změny genové dávky byl určen interval 0,8 – 1,2, pro heterozygotní delecí 0,3 – 0,7 a heterozygotní duplikaci 1,3 – 1,7, pro homozygotní delecí 0 – 0,2 a homozygotní duplikaci 1,8 – 2,2.

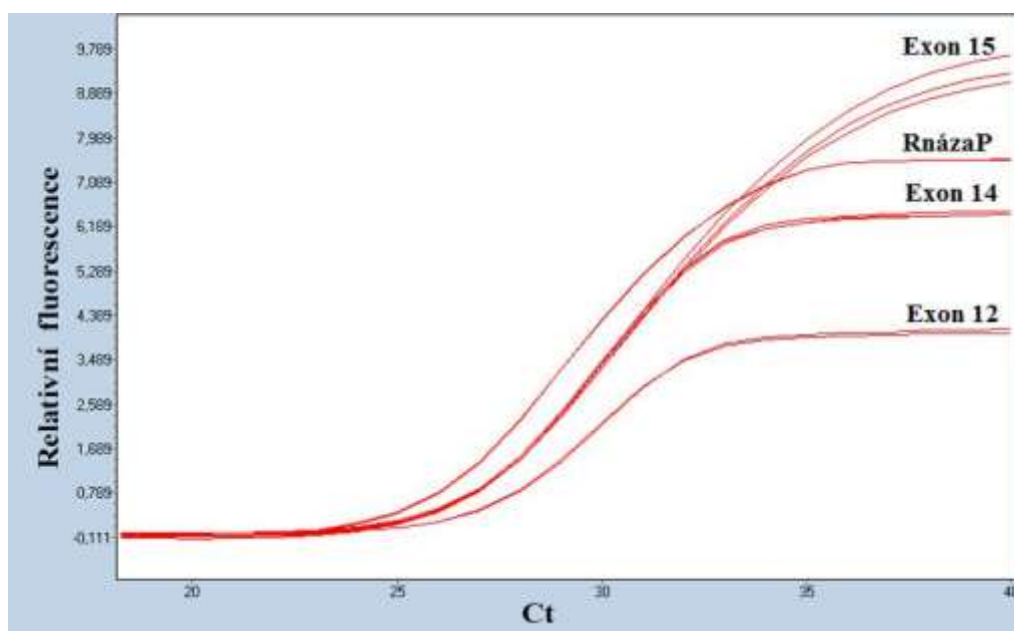
Primery pro reakci qPCR byly navrženy tak, aby s jejich použitím bylo možné detekovat změny genové dávky v prvních 23 exonech genu *NOTCH3*. Jejich funkčnost a specifita byla ověřena pomocí PCR reakce a následným rozdělením na elektroforetickém gelu. Poté byly pro-

vedeny reakce qPCR pro všechny zkoumané exony u dvou pacientů a zdravé kontroly (Obr. 24). Jako referenční geny byly použity geny pro Rnazu P a Albumin. Hodnoty směrodatných odchylek mezi triplikáty byly maximálně 0,3. Signál z amplifikace některých exonů byl nulový a hodnoty $2^{-\Delta\Delta Ct}$ byly u mnoha exonů snižené či zvýšené.



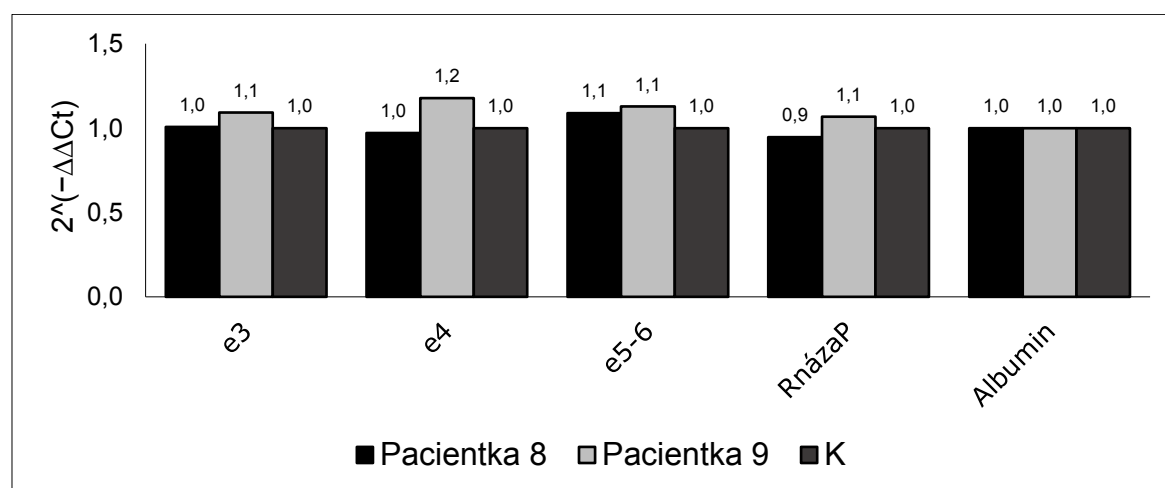
Obr. 24. Výsledný graf hodnot $2^{-\Delta\Delta Ct}$ dvou pacientů a zdravé kontroly pro 23 exonů a dva referenční geny. Graf pro větší přehlednost rozdělen do dvou částí.

Proto bylo provedeno několik pokusů ke zjištění, které parametry mohou ovlivňovat reakci qPCR. Při ředění genomové DNA na požadovanou vstupní koncentraci byl místo spektrofotometru použit fluorimet Qubit®. Přesnější měření koncentrace však nezlepšilo reakci qPCR, a tím bylo potvrzeno, že použití referenčních genů dobře vyvažuje nepřesnosti v měření vstupní koncentrace. Dále bylo vyzkoušeno přečištění vstupní DNA pomocí dialýzy v malém objemu (drop dialysis) s předstupněm čištění srážením ethanolem. Ačkoliv došlo ke slabému zlepšení fluorescenčních křivek amplifikace (Obr. 25), výsledné hodnoty $\Delta\Delta Ct$ zůstaly nevyrovnané.



Obr. 25. Graf znázorňující růst fluorescence se stoupajícím číslem cyklu (Ct). Jedná se o namnožení produktů pro exony 12, 14, 15 a pro Rnazu P jednoho vzorku DNA přečištěné pomocí srážení ethanolem a následnou dialýzou v malém objemu.

Ke zlepšení došlo až tehdy, kdy byly připravovány reakce pouze po několika zkoumaných exonech (Obr. 26), jelikož příprava reakce se zkrátila a fluorescenční sondy nebyly tak dlouho vystavené světlu.



Obr. 26. Graf hodnot $2^{-\Delta\Delta Ct}$ dvou pacientů 8 a 9 a zdravé kontroly při namnožení produktů pro exony 3, 4 a 5-6 a dvou referenčních genů RnazaP a Albumin.

Jelikož ani zkrácení doby přípravy nezlepšilo amplifikaci některých produktů, bylo potřeba připravit pokus pro zjištění citlivosti metody qPCR, aby se ověřila správnost předem určených intervalů hodnot $\Delta\Delta Ct$. Proto byly uměle vytvořeny pozitivní kontrolní vzorky nesoucí delecí. Tyto kontrolní vzorky byly připravené ošetřením DNA restrikčním enzymem BclI, který štěpí v sekvenci T/GATCA. V exonu 16 genu *NOTCH3* se nachází sekvence CGATCA,

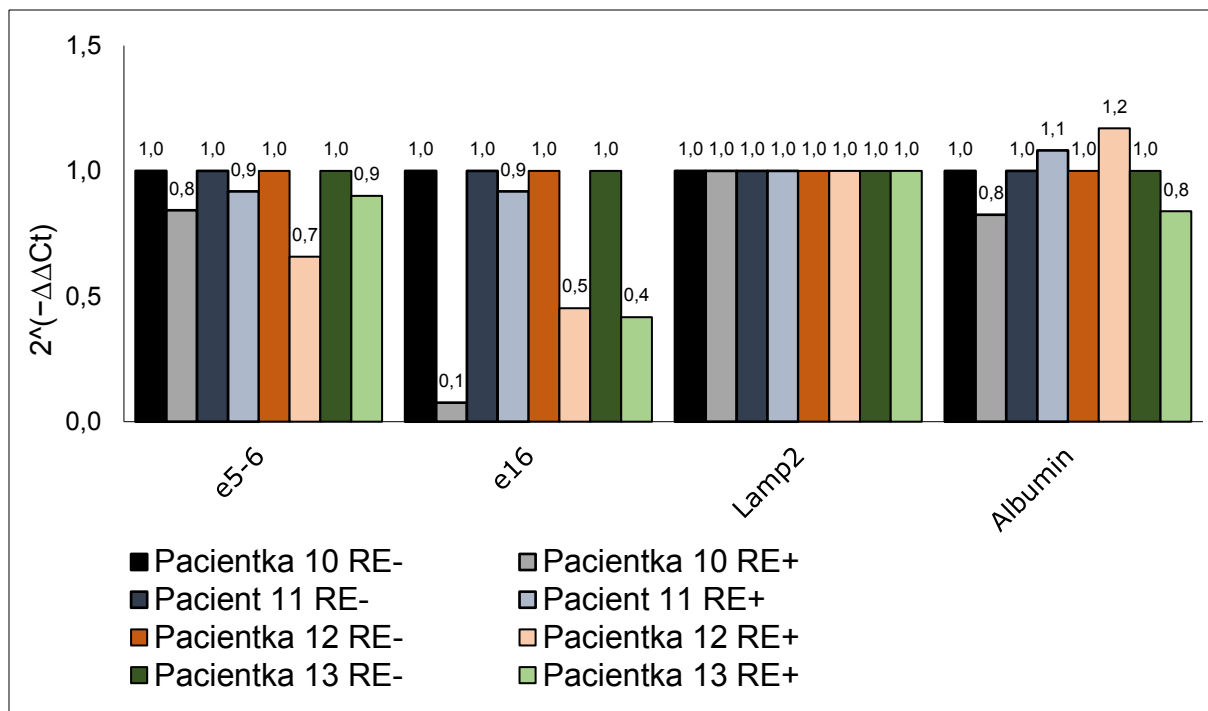
ve které se nachází polymorfismus c.2538C>T, měnící sekvenci na TGATCA. Proto bylo možné ošetřením vzorků nesoucí polymorfismus v místě štěpení restrikčního enzymu připravit jak vzorky imitující změnu genové dávky homozygotně, tak heterozygotně. Reakce qPCR byla provedena s primery pro exon 16 a s primery pro oblast exonů 5 a 6, kde by enzym neměl působit. Jako referenční geny byly použity geny pro Lamp2 a Albumin.

Reakce byla provedena se vzorky pacientů 10, 11, 12 a 13 (Tab. 4), u kterých jsou díky sekvenování kódujících oblastí a přilehlých částí intronů známy varianty polymorfismů, které nesou. Každý vzorek pacienta byl vložen dvakrát – jednou ošetřený a jednou neošetřený restrikčním enzymem. U pacienta 10, který nesl polymorfismus homozygotně, byly restrikčním enzymem rozštěpeny obě alely, což imitovalo delecii v homozygotním stavu. Pacient 11 naopak nesl homozygotně variantu polymorfismu, která není rozpoznávána restrikčním enzymem. Pacientky 12 a 13 nesly daný polymorfismus heterozygotně a jejich vzorky ošetřené enzymem měly imitovat heterozygotní delecii.

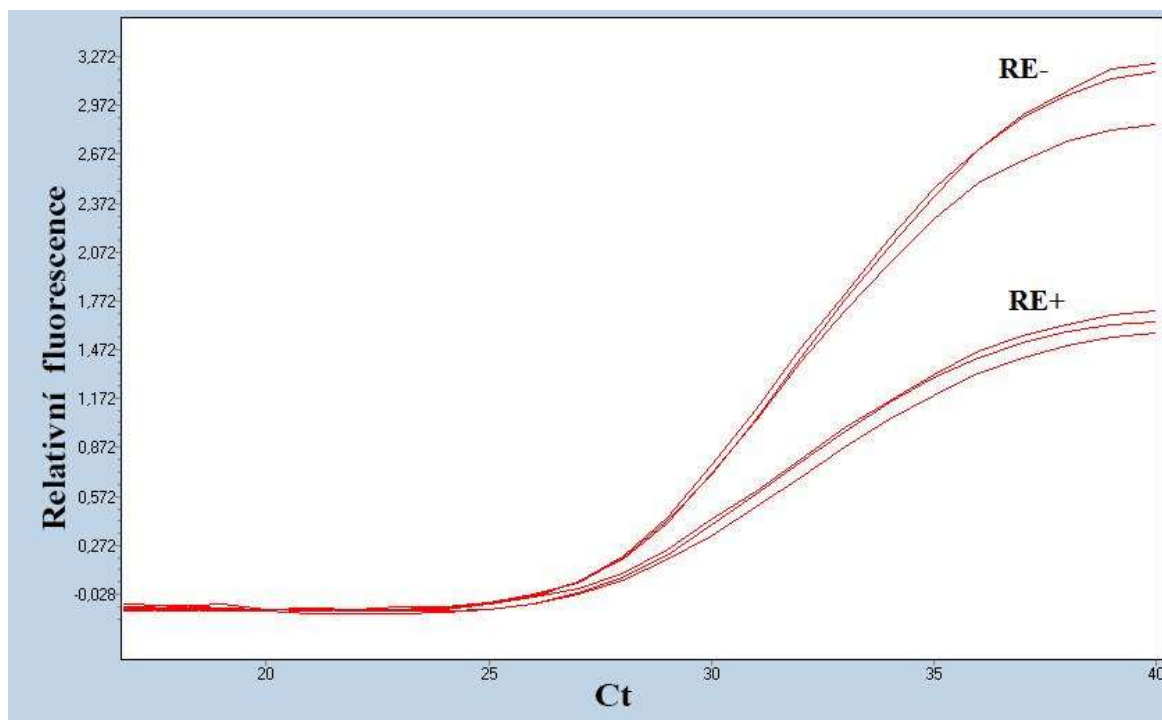
Výsledné hodnoty $2^{-\Delta\Delta Ct}$ produktů pro exon 16 odpovídaly předpokladům (Obr. 27). Pacientka 10 vykazovala homozygotní delecii, pacient 11 s hodnotami 1,0 a 0,9 nevykazoval změnu a pacientky 12 a 13 vykazovaly poloviční množství DNA (Obr. 28). Rozdíl v čísle cyklu (Ct) mezi heterozygoty s a bez ošetření restrikčním enzymem byl 0,6 a 0,5 cyklu.

V produktu pro exon 5-6 by měly hodnoty všech pacientů být okolo hodnoty 1, ačkoliv restrikčním enzymem ošetřený vzorek pacientky 12 s hodnotou 0,7 vykazuje již určité snížení. Místo pro restrikční enzym se tam ale nenachází.

Všechny výsledky byly vztaženy k hodnotám produktu genu *LAMP2* a směrodatné odchylky v triplicátech nepřekročily hodnotu 0,3.



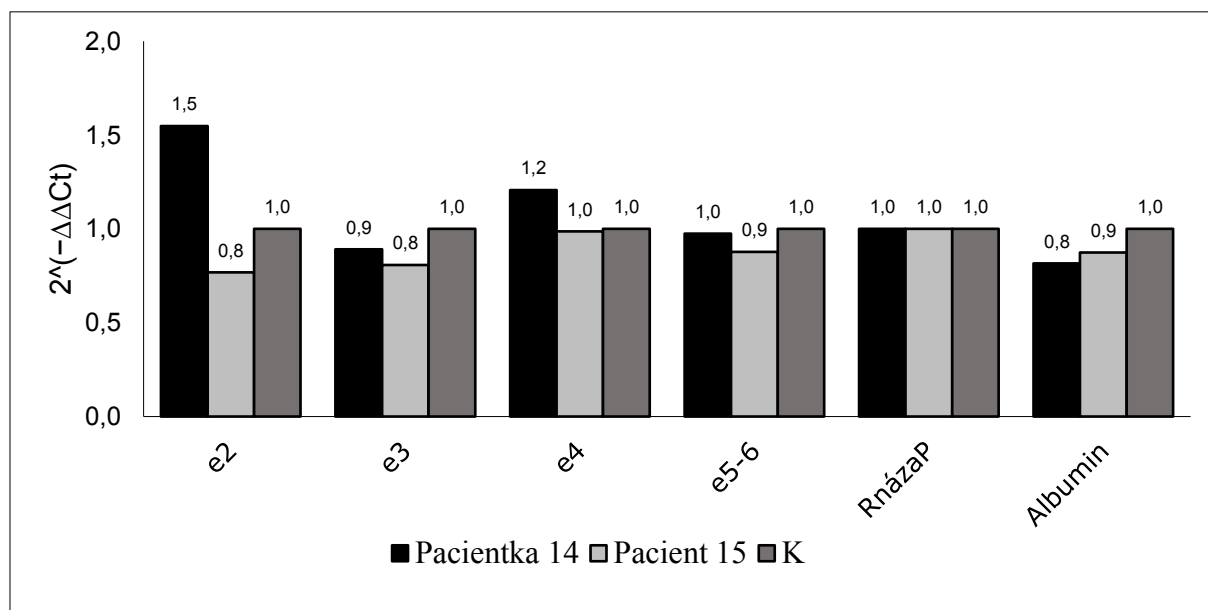
Obr. 27. Výsledný graf hodnot $2^{-\Delta\Delta C_t}$ v úseku pro exony 5-6 (e5-6) a exon 16 (e16) a dvou referenčních genů (vztaženo ke genu *LAMP2*). Vždy je vedle sebe vzorek jednotlivých pacientů neošetřený (RE-) a ošetřený restrikcí enzymem (RE+). Pacientka 10 nese polymorfismus, ve kterém RE štěpí homozygotně, pacient 11 naopak nese homozygotně variantu, ve které RE neštěpí, a pacientky 12 a 13 jsou heterozygotní pro tento polymorfismus.



Obr. 28. Graf závislosti relativní fluorescence na čísle cyklu amplifikace. Je vidět rozdíl mezi vzorkem pacientky 12 neošetřeným (RE-) a ošetřeným (RE+) restrikcí enzymem při amplifikaci produktu pro exon 16.

Poté bylo provedeno vyšetření metodou qPCR vzorků dvou suspektních pacientů 14 a 15 se zdravou kontrolou (Obr. 29). Vyšetření bylo zatím provedeno pouze v exonech 2, 3, 4, a 5-6. Jako referenční geny byly použity geny pro RnázuaP a Albumin. Všechny vzorky DNA byly čerstvě izolované ze zmražené krve.

Výsledky pacientky 14 vykazovaly zvýšení genové dávky v produktu pro exon 2. Hodnota $2^{-\Delta\Delta Ct}$ odpovídala heterozygotní duplikaci. Proto bylo následně provedeno vyšetření metodou MLPA (pro výsledky viz kapitola 5.4). Směrodatné odchylky v triplikátech nepřekročily hodnotu 0,2 a hodnoty byly vztaženy k hodnotám referenčního genu RnázuaP.

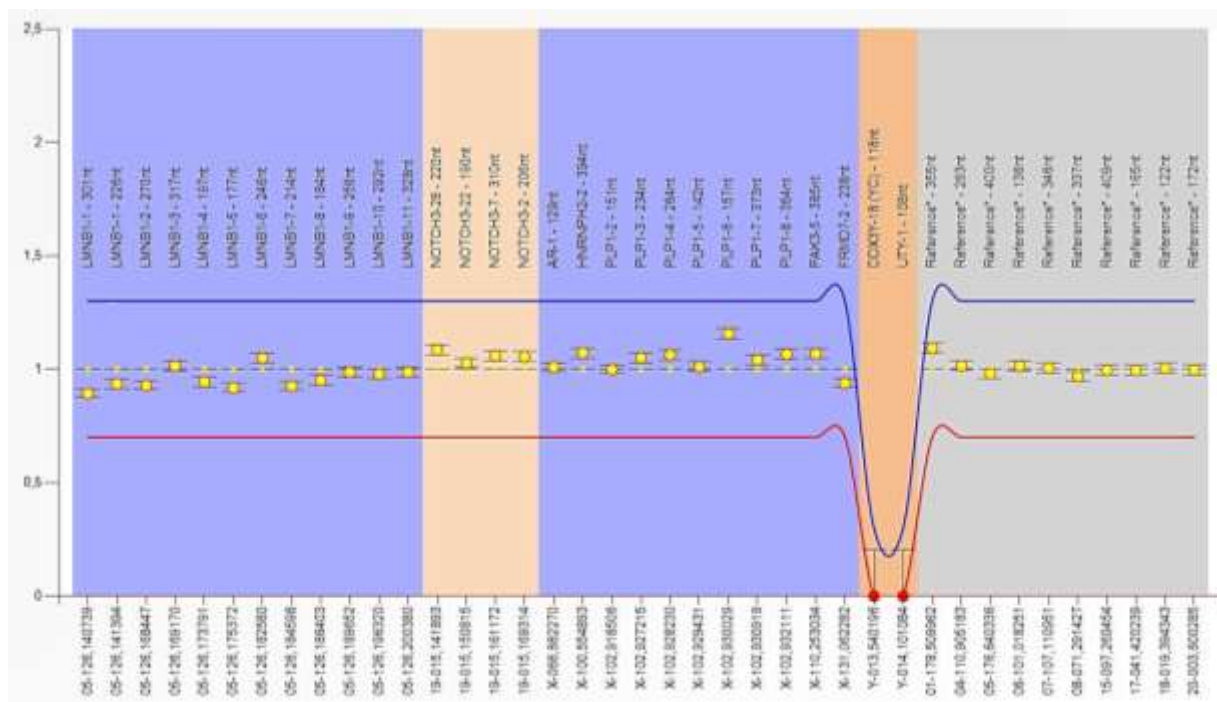


Obr. 29. Výsledný graf qPCR reakce vzorků pacientů 14 a 15 a zdravé kontroly v produktech pro exony 2, 3, 4, 5-6 a dvěma referenčními geny. Výsledek naznačuje zvýšení genové dávky v produktu pro exon 2 u pacientky 14.

5.4 Potvrzení výsledků metodou MLPA

Metoda MLPA byla provedena pro ověření pokusu qPCR, ve kterém výsledky naznačovaly heterozygotní duplikaci v produktu exonu 2 ve vzorku pacientky 14. Metoda MLPA byla provedena se vzorky pacientky 14, pacienta 15, mužské kontroly stejné jako v reakci qPCR a navíc ještě s další ženskou a mužskou kontrolou. Vzhledem k tomu, že použitá sada SALSA MLPA probemix P071-A1 Leukodystrophy- LMNB1, PLP1, NOTCH3 obsahuje jak kontrolní sondy pro Y chromozom, tak i sondy pro gen ležící na X chromozomu, nebylo možné v dodaném programu Coffalyser.NET porovnat vzorky s mužskými a ženskými kontrolami zároveň. Proto byly pro výstupní analýzu porovnány výsledky pacientky 14 s ženskou kontrolou a pacienta 15 s mužskou.

Výsledky z metody MLPA nepotvrdily výsledky z qPCR. Nebyla zjištěna změna genové dávky pro exon 2 genu *NOTCH3* ve vzorku pacientky 14 (Obr. 30). Hodnoty pro všechny testované úseky pacientky 14 a pacienta 15 byly v normě.



Obr. 30. Výsledná analýza metody MLPA vzorku pacientky 14 srovnána s ženskou kontrolou. Hodnoty všech úseků včetně exonu 2 genu *NOTCH3* jsou v normě. Nulový signál vykazovaly sondy na chromozomu Y.

6 Diskuze

Cílem této práce bylo zavést nové metody pro studium molekulárně genetické podstaty onemocnění CADASIL, přispět tak k prokázání nových patogenních variant u pacientů, kteří vykazují příznaky charakteristické pro onemocnění CADASIL, a pokusit se objasnit jejich patogenitu. Metody byly zaměřeny na prvních 23 exonů genu *NOTCH3*, které kódují extracelulární část proteinu a jsou oblastí s hlavním výskytem kauzálních mutací (Joutel et al., 1997b).

Podle registru genetického vyšetřování vedeného Národním Centrem pro Biotechnologické Informace NCBI ([online], dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/>, [cit. 2017-03-15]) se v současnosti po celém světě pro diagnostiku onemocnění CADASIL využívá především sekvenování nové generace či Sangerovou metodou. Sekvenuje se buď celá kódující oblast, nebo jen vybrané exony. Pro analýzu duplikací nebo delecí se využívá sekvenování nové generace, komparativní genomová hybridizace nebo metoda MLPA.

Cílem této práce bylo zavést analýzu transkriptu pro detekci změn sestřihu a stability mRNA a metodu kvantitativní PCR v reálném čase pro analýzu velkých duplikací či delecí na úrovni genomové DNA.

První metoda, která byla v rámci této diplomové práce zavedena, byla analýza transkriptu pomocí sekvenování PCR produktů cDNA Sangerovou metodou. Během optimalizace této metody byla potvrzena existence dvou typů transkriptů genu *NOTCH3* u kontrolních vzorků. Existence druhého identifikovaného jako X1 transkripční varianta (NCBI sekvence: XM_005259924.4) byla zatím podle NCBI anotačního pracovního postupu ([online], dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_euk/process/, [cit. 2017-01-25]) pouze předpokládána díky analýze *in silico*. V sekvenci mRNA varianty X1 chybí celý exon 16 a prvních 61 nukleotidů v 5'UTR oblasti a posledních 18 adenosinových zbytků na 3' konci. Na úrovni proteinu nedochází k posunu čtecího rámce, ale ke změně jednoho aminokyselinového zbytku a delecí 52 dalších aminokyselinových zbytků. Tato delece zahrnuje celou EGF-like repetici 21 a několik aminokyselinových zbytků z EGF-like repetice 20 a 22. Dochází tak k delecí všech 6 cysteinových zbytků náležících EGF-like repetici 21 (Cys814, Cys820, Cys826, Cys835, Cys837 a Cys846) a jednoho cysteinového zbytku z EGF-like repetice 20 (Cys807) a jednoho z EGF-like repetice 22 (Cys853). V těchto repeticích dochází k rozrušení disulfidických můstků (Cys798 + Cys807 a Cys853 + Cys864), a Cys798 a Cys864 tak zůstávají nepárové. Jelikož byla transkripční varianta X1 v rámci této diplomové práce nalezena ve vzorcích DNA zdravých kontrol, je pravděpodobné, že delece exonu 16 nemá patogenní

účinek. Ačkoliv delecí dochází ke změně cysteinových zbytků, je možné, že delece sudého počtu cysteinových zbytků může vést k náhradnímu párování zbylých cysteinových zbytků (Cys798 a Cys864) disulfidickým můstkem. Toto párování by mohlo přispět k tomu, aby se protein sbalil do strukturně pozměněné, ale funkční terciální struktury. Případná funkce EGF-like repetice 21 pak pravděpodobně může být dostatečně kompenzována funkcí ostatních EGF-like repetic.

Podle databáze HGMD ([online], dostupné z: <https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/all.php>, [cit. 2017-03-27]) byla v této oblasti zaznamenána pouze jediná záměna c.2519G>A (p.G840E) (Chida et al., 2014). Tato mutace byla nalezena u dětského pacienta s plicní arteriální hypertenzí s těžkým průběhem, který zemřel v 7 letech. Proto není pravděpodobné, že by záměna v této oblasti způsobovala onemocnění CADASIL.

Analýza transkriptu byla provedena se vzorky 6 pacientů, u nichž byla Sangerovým sekvenováním PCR produktů z genomové DNA nalezeny varianty, které nemění počet cysteinových zbytků ve vznikajícím proteinu. U pacienta 1 nesoucího heterozygotně variantu c.218G>A (p.G73V), u pacientky 2 nesoucí heterozygotně variantu c.1490C>T (p.S497L) i u pacientky 16 nesoucí heterozygotně variantu c.3601C>A (p.R1201S) nebyly nalezeny žádné změny sestřihu transkriptu. Ve všech případech byla varianta přítomna v heterozygotním stavu, což vylučuje patogenní vliv těchto variant na stabilitu alel.

Varianta c.218G>A (p.G73V) u pacienta 1 způsobuje změnu glycinového aminokyselinového zbytku za valinový v EGF-like repetici 1. Tato repetice se řadí spolu s EGF-like repeticemi 2-5 do míst s nejčastějším výskytem kauzálních mutací (Joutel et al., 1996, 1997b; Liu et al., 2015; Peters and Opherk, 2005). V EGF-like repetici 1 bylo dosud popsáno 20 jednonukleotidových záměn spojených s onemocněním CADASIL, z toho 3 nemění počet cysteinových zbytků. Dvě z nich p.R75Q a p.R75P jsou určeny jako patogenní, zbývající p.R61W jako varianta s nejasnou patogenitou.

Zde uvedená varianta však nebyla zatím popsána v literatuře a vzhledem k výsledkům *in silico* analýzy byla určena jako varianta s neznámou patogenitou. Výskyt této substituce je vzácný, jelikož není uvedena v databázích ExAc ani 1000 Genomes ([online], dostupné z: <http://exac.broadinstitute.org/> a <http://phase3browser.1000genomes.org/index.html> [cit. 2017-03-27]). Pro patogenitu této varianty svědčí výsledky predikčních programů PolyPhen-2 (Maathuis et al., 2010), SIFT (Kumar et al., 2009) a Mutation Taster (Schwarz et al., 2014), podle kterého dochází ke změně sestřihového místa. To je v souladu s analýzou provedenou

programem Human Splicing Finder (Desmet et al., 2009), jehož výsledky ukazují, že může touto substitucí docházet ke vzniku 2 nasedacích míst pro enhancery sestřihu a ke vzniku nového donorového místa. Naopak nepatogenitu podporují výsledky *in silico* analýzy 2 programů: Splice Site Prediction (Reese et al., 1997) a Center for biological sequence analysis (CBS) (Johansen et al., 2013), které ukazují, že substituce neovlivňuje donorové sestřihové místo.

Jak bylo napsáno výše, analýzou transkriptu tohoto pacienta změna v sestřihu nebyla nalezena. Jelikož je patogenita této varianty stále neznámá a analýza transkriptu neobjevila změny v transkriptu, bylo by vhodné navrhnout pacientovi odběr kožní biopsie a provést analýzu přítomnosti ložisek GOM a změn struktury buněk hladké svaloviny cév, což jsou znaky typické pro onemocnění CADASIL (Tikka et al., 2009).

Varianta c.1490C>T (p.S497L) v heterozygotním stavu, kterou nese pacientka 2, byla již popsána u 79letého pacienta s těžkými lézemi v bílé hmotě mozkové (Schmidt et al., 2011). Podle výsledků molekulárního modelování použitého v této studii, které je založeno na predikci podle homologie částí proteinu k podobným strukturám, je možné, že by tato varianta mohla mít vliv na sbalování EGF-like repetice 12. Podle *in silico* analýzy programem Mutation Taster (Schwarz et al., 2014) byla tato varianta vyhodnocena jako patogenní podle kritérií: a) jedná se o missense mutaci, b) proteinová struktura může být narušena, c) varianta může mít vliv na sestřih exonu 9. Naopak výsledky predikčních programů SIFT a PolyPhen-2 použitých v dané studii popisují variantu jako tolerovanou a benigní záměnu. Pro to, že je varianta nepatogenní, svědčí i relativně vysoká četnost výskytu v populaci udávaná podle databáze ClinVar v rozmezí 0,74 - 1,2 % ([online], dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/256121/>, [cit. 2017-03-27]). Navíc při imunohistochemickém vyšetření vzorku pacientky 2 nebyla nalezena zvýšená přítomnost proteinu Notch3 na povrchu buněk hladké svaloviny cév.

Varianta c.3601C>A (p.R1201S), nalezená u pacientky 16, nebyla dosud popsána v literatuře. Touto záměnou dochází k substituci polárního aminokyselinového zbytku s pozitivním nábojem (argininový) na polární nenabitý zbytek (serinový) v EGF-like repetici 30. Tato záměna může změnou náboje vést ke změně v terciální struktuře proteinu, a tak způsobovat částečnou či úplnou změnu ve funkci proteinu. Možnou patogenitu podporuje i to, že je tato varianta velmi vzácná, jelikož se nevyskytuje v databázích variant. Podle tří predikčních programů Mutation Taster (Schwarz et al., 2014), PolyPhen-2 (Maathuis et al., 2010) a MutPred

(Li et al., 2009), který je založen na predikčním systému SIFT (Kumar et al., 2009), je pravděpodobně patogenní. Ovšem elektronmikroskopickým vyšetřením nebyly nalezeny žádné změny ve struktuře buněk hladké svaloviny cév ani ložiska GOM, což by naopak poukazovalo na nepatogenitu této varianty. Kožní biopsie však nemusí být vždy prokazatelná, protože nemusí být zachycené poškozené tepny (Markus et al., 2002). V tomto případě však bylo uvedeno, že přítomnost malých tepen byla dostatečná, aby vzorek byl reprezentativní.

V literatuře bylo zmíněno, že mutace ve vzdálenějších EGF-like repeticích vedou k mírnějším projevům (Pescini et al., 2008; Valenti et al., 2011). Podle dodaných informací od ošetřujícího neurologa pacientka 16 do svých 40 let prodělala již dvě cévní mozkové příhody a trpí levostrannou ztrátou hybnosti. Jelikož další klinické údaje ani informace o magnetické rezonanci nebyly dodány, není možné přesně zhodnotit sílu projevů a porovnat s projevy pacientů s mutacemi v podobné oblasti genu. V EGF-like repetici 30 jsou podle databáze HGMD popsány pouze dvě jednonukleotidové varianty, u obou není známá jejich patogenita a obě nemění počet cysteinových zbytků. Popsaná pacientka s variantou p.D1184E v 58 letech nevykazovala depresi, migrény či cévní mozkové příhody, ale změny bílé hmoty na MRI naznačovaly onemocnění CADASIL (Kilariski et al.). Pacient s variantou p.R1175W měl ve 42 letech popsány změny na MRI včetně lakunárních infarktů a změn v capsula externa a trpěl depresemi (Xinzhen Yin et al., 2015). I pacienti s mutacemi v dalších vzdálenějších EGF-like repeticích vykazují různou míru poškození mozku a dalších symptomů (Pescini et al., 2008; Rinnoci et al., 2013; Schmidt et al., 2011; Valenti et al., 2011). U většiny z nich však chybí migrény i další subjektivní projevy, ale výsledky magnetické rezonance většinou odpovídají poškození bílé hmoty mozkové při onemocnění CADASIL. Mírnější projevy mohou být způsobené tím, že vzdálenější EGF-like repetice nemají takový vliv na sbalování nebo funkci proteinu jako ty bližší.

Pro objasnění patogenity této varianty by bylo vhodné do budoucna vzorek analyzovat metodou RNA sekvenování nové generace pro zjištění minoritních změn na úrovni transkriptu, které je Sangerovým sekvenováním těžké odhalit.

Varianta neznámé patogenity c.1725G>A (p.T575=) byla nalezena v heterozygotním stavu u tří pacientů (pacienti 3, 4, 5). Predikční program Mutation Taster (Schwarz et al., 2014) tuto variantu vyhodnotil jako patogenní mutaci, programy Human Splicing Finder (Desmet et al., 2009) a Splice Site Prediction (Reese et al., 1997) jako záměnu, která může ovlivňovat sestřih buď tvorbou nového sestřihového místa nebo tvorbou nového motivu pro nasedání silenceru sestřihu.

Výsledky analýzy transkriptu jsou v souladu s *in silico* analýzou. Při analýze transkriptu byla zjištěna přítomnost dvou různě dlouhých PCR produktů v oblasti exonů 9-13. Kromě nemutované alely transkriptu byla prokázána i přítomnost transkriptu s delecí 120 bp (r.1607_1726del120). Tato delece vede na proteinové úrovni k delecí 40 aminokyselinových zbytků bez posunu čtecího rámce (p.F537_G576del). Chybějící úsek obsahuje 6 cysteinových zbytků - Cys542, Cys549, Cys554, Cys559, Cys568 a Cys570, které se podle katalogu UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9UM47>) párují 533+542, 549+559, 554+568 a 570+579 disulfidovými můstky. Cysteinové zbytky Cys533 a Cys579 leží mimo deletovaný úsek a v případě delece se nemohou správně spárovat. Disulfidický můstek mezi Cys533 a Cys542 leží v EGF-like repetici 13, ostatní uvedené v EGF-like repetici 14. Při delecí dochází k delecí posledních 5 aminokyselinových zbytků EGF-like repetice 13 a skoro celé repetice 14.

Minoritně byla u pacienta 3 detekována také sestřihová varianta, která kromě uvedené delece 120 bp (z exonu 11) obsahovala i delecí celého exonu 12 (r.1841_1951del111). Ta způsobuje na úrovni proteinu delecí 37 aminokyselinových zbytků bez posunu čtecího rámce (p.V615_G651del). V tomto deletovaném úseku je přítomno 6 cysteinových zbytků – Cys617, Cys624, Cys629, Cys634, Cys643 a Cys645, které se párují disulfidickými můstky: 608+617, 624+634, 629+643 a 645+654. Cysteinové zbytky Cys608 a Cys654 leží mimo delecí. Disulfidický můstek mezi Cys608 a Cys617 leží v EGF-like repetici 15, ostatní v EGF-like repetici 16. Touto delecí dochází k delecí 3 posledních aminokyselinových zbytků EGF-like repetice 15 a skoro celé repetice 16.

PCR produkty fragmentů 4-5 pacienta 3 byly sekvenovány také metodou nové generace, aby bylo možné pozorovat i další případné změny v transkriptu, které by Sangerovým sekvenováním nebylo možné detekovat. Výsledky sekvenování nové generace potvrdily výsledky analýzy transkriptu a bylo možné kvantifikovat rozdíl ve výskytu alely G a A v lokusu c.1725. Tato kvantifikace ukázala, že nesestřižená alela A se vyskytuje ve 32% čtení, a proto nejde o 100% využívané sestřihové místo. Je možné, že různá míra využívání sestřihového místa může vést k různé síle projevů mezi pacienty se stejnou záměnou. Do budoucna by bylo možné sekvenovat cDNA genu *NOTCH3* i dalších suspektních pacientů s variantou neznámé patogenity. Je to však metoda finančně náročnější, proto by bylo možné ji používat hlavně k sekvenování vzorků těch pacientů, u kterých metodou Sangerova sekvenování nebyla změna sestřihu či stability mRNA nalezena.

Terciální struktura proteinu Notch3 v plné délce není zatím určena. Struktury v databázi proteinů ([online], dostupné z <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> [cit. 2017-03-27]) obsahují pouze C-konec tohoto proteinu, což nelze k predikci vlivu delecí v oblasti EGF-like domén na sbalování využít. Proto není možné přesně modelovat, jak identifikované delece zahrnující několik cysteinových zbytků ovlivňují proteinovou strukturu a jak dále interagují ty cysteinové zbytky, které zůstaly v proteinu po přerušení disulfidických můstků. Je možné se pouze domnívat, že dochází k významné změně terciální struktury, která vede k porušení funkce proteinu. S objevením terciální struktury proteinu Notch3 v plné délce by bylo možné predikovat vliv mutací na protein a bylo by možné lépe pochopit patogenní vliv jednotlivých mutací.

Výsledky analýzy transkriptu prokázaly, že varianta nejasné patogenity c.1725G>A (p.T575=) nemění aminokyselinový zbytek v proteinu ovlivňuje sestřih mRNA a následně počet cysteinových zbytků v proteinu Notch3, což odpovídá typické mutaci vedoucí k onemocnění CADASIL. Změnou počtu cysteinových zbytků dochází ke změně v párování cysteinových zbytků disulfidickými můstky a ke vzniku chybně uspořádaného proteinu. Tento náález podporuje hypotézu patogeneze onemocnění, že právě chybné sbalování proteinu způsobené mutací ovlivňující terciální strukturu vede k tvorbě nefunkčního proteinu Notch3, a tím k projevům onemocnění CADASIL (Dichgans et al., 2000).

Analýza transkriptu byla provedena pouze se vzorky od 6 pacientů, protože pro izolaci RNA je potřeba čerstvě odebraná krev, aby se zabránilo degradaci RNA působením RNáz. Množství vzorků pro tuto analýzu bylo závislé na množství vzorků od pacientů s netypickou variantou v genu *NOTCH3* s podezřením na onemocnění CADASIL, které byly přijaty Laboratoří DNA diagnostiky ÚDMP během tohoto výzkumu. Tato metoda se osvědčila a do budoucna je možné ji aplikovat pro diagnostiku variant s nejasnou patogenitou u dalších pacientů.

Druhou metodou, která byla testována v rámci této diplomové práce, je metoda kvantitativní PCR v reálném čase pro určení velkých delecí či duplikací. Již zavedenou metodou MLPA pro detekci velkých delecí či duplikací bylo v Laboratoří DNA diagnostiky ÚDMP dříve vyšetřeno 19 suspektních pacientů. Všechny výsledky však byly negativní, což může být dané tím, že sada pro metodu MLPA obsahuje sondy pouze pro 4 exony genu *NOTCH3*. Pro metodu qPCR byly navrženy primery pro vyšetření všech 23 exonů genu kódujících extracelulární část proteinu.

Během optimalizace qPCR se ukázalo, že prováděním této metody pro všech 23 exonů najednou pravděpodobně dochází k poškození sond, které jsou po dobu přípravy reakce vystavené světlu. Proto byl počet použitých sond snížen na několik exonů v jednom pokusu, což vedlo ke zlepšení výsledných hodnot. Dále bylo prokázáno, že přesnost měření koncentrace vstupní DNA není kritickým bodem, jelikož použití referenčních genů vyrovnává nepřesnosti.

Během pokusů s uměle vytvořenými kontrolami pro snížení genové dávky pomocí restrikčního enzymu bylo zjištěno, že rozdíl mezi hodnotami Ct heterozygota nesoucího delecii a zdravého jedince je pouze 0,5 - 0,6 cyklu, což je velmi malý rozdíl a při absenci pozitivních kontrolních vzorků je vyhodnocování obtížné. Kontrolní vzorky pro delecii bylo možné uměle vytvořit pomocí restrikčních enzymů, ale vytvořit uměle duplikaci obohacením vkládané DNA o přesný počet molekul určitého úseku genu *NOTCH3* by bylo velmi náročné. Nejlepším způsobem by bylo získat kontrolní vzorky z jiných laboratoří, kde byla delece či duplikace v genu *NOTCH3* již prokázána. Popsána byla velká heterozygotní delece zahrnující exony 3-16, ale pacient je na druhé alele nositelem typické mutace (Rutten et al., 2013). Delecii, která způsobuje předčasný vznik stop-kodónu v exonu 17, zdědil od otce, který vykazuje psychiatrické problémy, ale ne cévní mozkové příhody ani demenci. Ačkoliv tato delece nemusí být kauzální, vzorek může posloužit jako pozitivní kontrola delece v heterozygotním stavu. Popsána byla i delece 100 bp ve 4. exonu (Weiming et al., 2013). Tato delece však není v místě ohraničeném současnými primery pro sondu v tomto exonu, a proto by se musely navrhnout nové. Delece v homozygotním stavu a ani žádné rozsáhlé duplikace nebyly zatím popsány.

Ačkoliv podle kolegů z ÚDMP byly určeny rozmezí hodnot po výpočtu $2^{-\Delta\Delta Ct}$ pro vzorky beze změny genové dávky 0,8 – 1,2, pro heterozygotní delecii 0,3 – 0,7 a heterozygotní duplikaci 1,3 – 1,7, pro homozygotní delecii 0 – 0,2 a homozygotní duplikaci 1,8 – 2,2, kvůli absenci pozitivních kontrolních vzorků pro delecii či duplikaci v genu *NOTCH3* nelze ověřit, zda tato rozmezí byla vybrána správně. V literatuře se tato rozmezí pro jiné geny lehce liší. Například v jedné studii (Maksimovic et al., 2012) by výsledkům bez změny genové dávky mělo odpovídat rozmezí 0,87 - 1,27 a pacientovi s heterozygotní delecí 0,45 - 0,67. V jiné studii (Vaughn et al., 2008) odpovídá zdravému člověku hodnota již od 0,78 do 1,28 a pacientovi s heterozygotní delecí hodnota od 0,42 do pouze 0,55. Při tomto rozmezí je těžké identifikovat, zda je například hodnota 0,7, která byla detekována v rámci této práce, přísluší nezměněné genové dávce či dávce odpovídající heterozygotní delecii. Hodnoty $2^{-\Delta\Delta Ct}$ pro zjišťování duplikací v literatuře chybí.

Vzhledem k tomu, že optimalizace této metody byla finančně i časově náročná, vyšetřeno bylo touto metodou jen několik pacientů. Pouze u 1 pacientky (pac. 14) bylo nalezeno zvýšení v genové dávce v produktu pro exon 2 odpovídající heterozygotní duplikaci. Tento výsledek byl ověřován metodou MLPA, která sondu pro exon 2 obsahuje. Metoda MLPA však duplikaci v tomto exonu, ani v dalších testovaných exonech, neukázala. Vzhledem k tomu, že UPL sonda i horní primer qPCR nasedají ve stejné oblasti, jako nasedají sondy MLPA, není možné, aby tento rozdíl byl způsoben případným polymorfismem v místě nasedání. Pravděpodobnějším důvodem může být nedostatečná sensitivita metody qPCR a nedostatečná optimalizace způsobena již zmiňovanou absencí pozitivních kontrolních vzorků.

Metoda qPCR se zatím pro vyšetření onemocnění CADASIL neosvědčila. Jako diagnostický nástroj je nevhodná, jelikož je potřeba několikanásobné opakování pokusů po menším počtu testovaných exonů, jsou potřeba alespoň 2 referenční geny a dostatek kontrolních vzorků. Pro optimalizaci i následné zavedení metody by pomohlo otestovat pozitivní kontroly na delecii a duplikaci a podle nich ověřit stanovená rozmezí hodnot pro změnu genové dávky. V některých studiích používají metodu qPCR pro zjištění genové dávky pouze pro ověření výsledků jiné metody, převážně metody MLPA (Cali et al., 2010; Vaughn et al., 2008).

Pacienti testovaní metodou qPCR byli dle klinických údajů relativně suspektní pro onemocnění CADASIL, MRI změny v bílé hmotě mozkové byly potvrzeny u všech pacientů. Migrény potvrzovali ale pouze dva pacienti a cévní mozkové příhody byly popsány pouze u jednoho z nich. Někteří pacienti jsou homozygotní pro větší množství testovaných jednonukleotidových polymorfismů v genu *NOTCH3*, což podporuje možnost, že jsou nositeli velké delecce či duplikace, které sekvenování PCR produktů pro jednotlivé exony Sangerovou metodou není schopné prokázat. Imunohistochemie pro zjištění přítomnosti proteinu Notch3 na povrchu buněk hladké svaloviny cév a elektronová mikroskopie pro analýzy přítomnosti GOM a změn struktur buněk hladké svaloviny cév byla provedena pouze u 1 pacientky (pac. 8). Vzorky byly poměrně reprezentativní, při imunohistochemii byl patrný granulární nález pozitivní na přítomnost proteinu Notch3 v cévách, který nebyl zcela charakteristický, ale velmi suspektní. Při mikroskopii sice shluky GOM nebyly nalezeny a buňky hladké svaloviny cév nejevily atrofii, ale bylo v nich nalezeno zmnožení mitochondriální populace a nepravidelnosti v uspořádání mitochondriálních membrán, což může odpovídat již popsaným změnám u pacientů s onemocněním CADASIL (Dotti et al., 2004; Viitanen et al., 2013).

I když v rámci této práce u pacientů testovaných metodou qPCR nebyla žádná delece či duplikace nalezena, není vyloučeno jejich onemocnění, je však potřeba zavést jinou, pravděpodobně citlivější, metodu, která by byla schopna detekovat slabé rozdíly mezi nezměněnou genovou dávkou a heterozygotní delecí či duplikací. Z výběru současných metod se zdá, že digitální PCR by mohlo být vhodnou volbou (Hindson et al., 2011; Vogelstein and Kinzler, 1999).

Podle databáze Orphanet je celosvětová prevalence onemocnění CADASIL 1-9/100 000 zdravých dospělých ([online], dostupné z: http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=EN&Expert=136, [cit. 2017-03-22]), v Evropě v rozmezí 1/50 000 – 1/25 000. Podle nejnovější studie je ale prevalence vyšší, a to ve světě 3,4/1 000 a v Evropě 1,3/1 000 zdravých dospělých (Rutten et al., 2016b). Podle množství diagnostikovaných pacientů v Laboratoři DNA diagnostiky ÚDMP je v České republice prevalence 8,3/1 050 000 zdravých dospělých obyvatel. Tato hodnota je diametrálně odlišná od udávaných hodnot prevalence v Evropě. Může to být způsobeno jak nižším povědomím lékařů o tomto onemocnění a z toho vycházející nesprávné diagnóze, tak i nedostatečnými metodami genetického vyšetření.

Zavedením metody analýzy transkriptu byl vysvětlen vliv jedné varianty na sestřih vedoucí k patogenní změně v počtu cysteinových zbytků v proteinu. Je pravděpodobné, že použitím této metody v budoucnu bude vysvětlen vliv dalších variant a množství diagnostikovaných pacientů vzroste. Ačkoliv použitím metody kvantitativní PCR v reálném čase nebyla zjištěna přítomnost žádné velké delece či duplikace, je možné, že zavedením citlivější metody bude možno změnu genové dávky v tomto genu detekovat.

7 Souhrn

V rámci této diplomové práce byla zavedena metoda analýzy mRNA genu *NOTCH3* metodou Sangerova sekvenování PCR produktů cDNA. Během optimalizace byla experimentálně potvrzena existence transkripční varianty X1. Dále byly otestovány čtyři varianty s neznámou patogenitou:

c.218G>A (p.G73V), c.1490C>T (p.S497L), c.3601C>A (p.R1201S) a c.1725G>A (p.T575=).

U prvních tří variant nebyla potvrzena změna na úrovni transkriptu bez vlivu na sestřih či stabilitu mRNA. Varianta c.1725G>A podle výsledků této práce vede ke vzniku dvou sestřihových variant, obě jsou beze změny čtecího rámce, ale obě vedou ke změně počtu cysteinových zbytků v proteinu Notch3, a tím i ke změně v disulfidických můstcích. Delece 120 nukleotidů (r.1607_1726del120) v exonu 11 vede k delecí 40 aminokyselinových zbytků včetně 6 cysteinových zbytků (p.F537_G576del) a delece 111 bp exonu 12 (r.1841_1951del111) pravděpodobně způsobuje delecí 37 aminokyselinových zbytků včetně dalších 6 cysteinových (p.V615_G651del). To může vést ke špatné terciální struktuře proteinu. Výsledky této práce ukázaly, že i netypická varianta, jako například tato synonymní záměna, ovlivňuje počet cysteinových zbytků v proteinu a může vést k onemocnění CADASIL.

Dále byla testována metoda kvantitativní PCR v reálném čase pro analýzu rozsáhlých delecí a duplikací genu *NOTCH3*. Tato metoda a její citlivost spolu s absencí pozitivních kontrolních vzorků se ukázala jako nevhodná pro studium molekulárně genetické podstaty onemocnění CADASIL a jeho diagnostiky. Pokud by byly k dispozici pozitivní kontrolní vzorky, je možné metodu využít k ověření jiné analyzační metody pro určení genové dávky jednoho nebo několika exonů genu *NOTCH3*.

8 Seznam použité literatury

- Annunen-Rasila, J., Finnilä, S., Mykkänen, K., Moilanen, J.S., Veijola, J., Pöyhönen, M., Viitanen, M., Kalimo, H., and Majamaa, K. (2006). Mitochondrial DNA sequence variation and mutation rate in patients with CADASIL. *Neurogenetics* 7, 185–194.
- Appella, E., Weber, I.T., and Blasi, F. (1988). Structure and function of epidermal growth factor-like regions in proteins. *FEBS Lett.* 231, 1–4.
- Barrois, M., Bièche, I., Mazoyer, S., Champème, M.H., Bressac-de Paillerets, B., and Lidereau, R. (2004). Real-time PCR-based gene dosage assay for detecting BRCA1 rearrangements in breast-ovarian cancer families. *Clin. Genet.* 65, 131–136.
- Baudrimont, M., Dubas, F., Joutel, a., Tournier-Lasserre, E., Boussier, M.G., and Avenue, G. (1993). Autosomal dominant leukoencephalopathy and subcortical ischemic stroke. A clinicopathological study. *Stroke* 24, 122–125.
- Bianchi, S., Dotti, M.T., Gallus, G.N., D'Eramo, C., Di Donato, I., Bernardi, L., Maletta, R., Puccio, G., Bruni, A.C., and Federico, A. (2013). First deep intronic mutation in the NOTCH3 gene in a family with late-onset CADASIL. *Neurobiol. Aging* 34, 2234.e9-12.
- Bignell, G.R., Huang, J., Greshock, J., Watt, S., Butler, A., West, S., Grigorova, M., Jones, K.W., Wei, W., Stratton, M.R., et al. (2004). High-Resolution Analysis of DNA Copy Number Using Oligonucleotide Microarrays. *Genome Res.* 14, 287–295.
- van den Boom, R., Lesnik Oberstein, S.A.J., Ferrari, M.D., Haan, J., van Buchem, M.A., Boom, R. van den, and Oberstein, S.L. (2003). Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy: MR Imaging Findings at Different Ages—3rd–6th Decades 1. *Radiology* 229, 683–690.
- Bray, S.J. (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 678–689.
- Calì, F., Ruggeri, G., Vinci, M., Meli, C., Carducci, C., Leuzzi, V., Pozzessere, S., Schinocca, P., Ragalmuto, A., Chiavetta, V., et al. (2010). Exon deletions of the phenylalanine hydroxylase gene in Italian hyperphenylalaninemias. *Exp. Mol. Med.* 42, 81–86.
- Chabriat, H., Vahedi, K., Iba-Zizen, M.T., Joutel, A., Nibbio, A., Nagy, T.G., Krebs, M.O., Julien, J., Dubois, B., and Ducrocq, X. (1995). Clinical spectrum of CADASIL: a study of 7 families. Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Lancet* 346, 934–939.
- Chantemèle, E. De (2008). Notch3 is a major regulator of vascular tone in cerebral and tail resistance arteries. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 2216–2224.
- Chida, A., Shintani, M., Matsushita, Y., Sato, H., Eitoku, T., Nakayama, T., Furutani, Y., Hayama, E., Kawamura, Y., Inai, K., et al. (2014). Mutations of NOTCH3 in childhood pulmonary arterial hypertension. *Mol. Genet. Genomic Med.* 2, 229–239.
- Desmet, F.-O., Hamroun, D., Lalande, M., Collod-Beroud, G., Claustres, M., and Beroud, C. (2009). Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res.* 37, e67–e67.
- Desmond, D., Moroney, J., Lynch, T., and Chan, S. (1999). The natural history of CADASIL a pooled analysis of previously published cases. *Stroke* 30, 1230–1233.
- Dichgans, M., Mayer, M., Uttner, I., Brüning, R., Müller-Höcker, J., Rungger, G., Ebke, M., Klockgether, T., and Gasser, T. (1998). The phenotypic spectrum of CADASIL: clinical findings in 102 cases. *Ann. Neurol.* 44, 731–739.
- Dichgans, M., Ludwig, H., Müller-Höcker, J., Messerschmidt, a, and Gasser, T. (2000). Small in-frame deletions and missense mutations in CADASIL: 3D models predict misfolding of Notch3 EGF-like repeat domains. *Eur. J. Hum. Genet.* 8, 280–285.
- Domenga, V., Fardoux, P., Lacombe, P., Monet, M., Maciazek, J., Krebs, L.T., Klonjowski, B., Berrou, E., Mericskay, M., Li, Z., et al. (2004). Notch3 is required for arterial identity and maturation of vascular smooth muscle cells. *Genes Dev.* 18, 2730–2735.

- Dotti, M.T., De Stefano, N., Bianchi, S., Malandrini, A., Battisti, C., Cardaioli, E., and Federico, A. (2004). A Novel NOTCH3 Frameshift Deletion and Mitochondrial Abnormalities in a Patient With CADASIL. *Arch. Neurol.* *61*, 942.
- Dotti, M.T., Federico, a, Mazzei, R., Bianchi, S., Scali, O., Conforti, F.L., Sprovieri, T., Guidetti, D., Aguglia, U., Consoli, D., et al. (2005). The spectrum of Notch3 mutations in 28 Italian CADASIL families. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* *76*, 736–738.
- Fouillade, C., Chabriat, H., Riant, F., Mine, M., Arnoud, M., Magy, L., Boussier, M.G., Tournier-Lasserre, E., and Joutel, A. (2008). Activating NOTCH3 mutation in a patient with small-vessel-disease of the brain. *Hum. Mutat.* *29*, 452.
- Furby, a, Vahedi, K., Force, M., Larrouy, S., Ruchoux, M.M., Joutel, a, and Tournier-Lasserre, E. (1998). Differential diagnosis of a vascular leukoencephalopathy within a CADASIL family: use of skin biopsy electron microscopy study and direct genotypic screening. *J. Neurol.* *245*, 734–740.
- Gibson, U.E.M., Heid, C.A., and Williams, P.M. (1996). A Novel Method for Real Time Quantitative RT-PCR. *Genome Methods* *6*, 995–1001.
- Ginzinger, D.G. (2002). Gene quantification using real-time quantitative PCR : An emerging technology hits the mainstream. *30*, 503–512.
- Ginzinger, D.G., Godfrey, T.E., Nigro, J., Ii, D.H.M., Suzuki, S., Pallavicini, M.G., Gray, J.W., and Jensen, R.H. (2000). Measurement of DNA Copy Number at Microsatellite Loci Using Quantitative PCR Analysis. *5405–5409*.
- Granata, A., Bernard, W.G., and Zhao, N. (2015). Temporal and Embryonic Lineage-Dependent Regulation of Human Vascular SMC Development by NOTCH3 1,2. *24*, 846–856.
- Gunda, B., Hervé, D., Godin, O., Bruno, M., and Reyes, S. (2012). Effects of gender on the phenotype of CADASIL. *Stroke* *43*, 137–141.
- Guruharsha, K.G., Kankel, M.W., and Artavanis-Tsakonas, S. (2012). The Notch signalling system: recent insights into the complexity of a conserved pathway. *Nat. Rev. Genet.* *13*, 654–666.
- Haruki, N., Kawaguchi, K.S., Eichenberger, S., Massion, P.P., Olson, S., Gonzalez, A., Carbone, D.P., and Dang, T.P. (2005). Dominant-Negative Notch3 Receptor Inhibits Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway and the Growth of Human Lung Cancers. *Cancer Res.* *65*.
- Hedrich, K., Kann, M., Lanthaler, A.J., Dalski, A., Eskelson, C., Landt, O., Schwinger, E., Vieregge, P., Lang, A.E., Breakefield, X.O., et al. (2001). The importance of gene dosage studies: mutational analysis of the parkin gene in early-onset parkinsonism. *Hum. Mol. Genet.* *10*, 1649–1656.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., and Williams, P.M. (1996). Real Time Quantitative PCR. *Genome Res.* *986–994*.
- Hindson, B.J., Ness, K.D., Masquelier, D.A., Belgrader, P., Heredia, N.J., Makarewicz, A.J., Bright, I.J., Lucero, M.Y., Hiddessen, A.L., Legler, T.C., et al. (2011). High-Throughput Droplet Digital PCR System for Absolute Quantitation of DNA Copy Number. | *Anal. Chem* *83*, 8604–8610.
- Ho, S.S.Y., Barrett, A., Thadani, H., Asibal, C.L., Koay, E.S.-C., and Mahesh, C. (2015). Application of real-time PCR of sex-independent insertion-deletion polymorphisms to determine fetal sex using cell-free fetal DNA from maternal plasma. *Clin. Chem. Lab. Med.* *53*, 1189–1195.
- Hu, L., Xue, F., Shao, M., Deng, A., and Wei, G. (2013). Aberrant expression of notch3 predicts poor survival for hepatocellular carcinomas. *Biosci. Trends* *7*, 152–156.
- Ichinohe, A., Takahashi, K., Tabira, T., and Takashima, S. (2004). Early and Late Development of Notch3 in Human Brains.
- Ishida, C., Sakajiri, K., and Yoshita, M. (2006). CADASIL with a novel mutation in exon 7 of NOTCH3 (C388Y). *Intern. Med.* *45*, 981–985.
- Ishiko, A., Shimizu, A., Nagata, E., Takahashi, K., Tabira, T., and Suzuki, N. (2006). Notch3 ectodomain is a major component of granular osmiophilic material (GOM) in CADASIL. *Acta Neuropathol.* *112*, 333–339.

- Jian Lin Yin, Nicholas A. Shackel, Amany Zekry, P.H.M., Craig Richards, Karien Van Der Putten, G.W.M., and Josette M. Eris and G. Alex Bishop (2001). Real-time reverse transcriptase–polymerase chain reaction (RT–PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I. *Immunol. Cell Biol.* 79, 213–221.
- Johansen, M.B., Izarzugaza, J.M.G., Brunak, S., Petersen, T.N., and Gupta, R. (2013). Prediction of Disease Causing Non-Synonymous SNPs by the Artificial Neural Network Predictor NetDiseaseSNP. *PLoS One* 8, e68370.
- Joutel, A. (2000). De Novo Mutation in the Notch3 Gene Causing CADASIL. *Ann. Neurol.* 47, 388–391.
- Joutel, A., and Corpechot, C. (1997). cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL), a mendelian condition causing stroke and vascular dementia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 826, 213–217.
- Joutel, A., Corpechot, C., Ducros, A., Vahedi, K., Chabriat, H., Mouton, P., Alamowitch, S., Domenga, V., Cécillion, M., Marechal, E., et al. (1996). Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature* 383, 707–710.
- Joutel, A., Corpechot, C., Ducros, A., Vahedi, K., Chabriat, H., Mouton, P., Alamowitch, S., DOMENGA, V., CÉCILLION, M., MARÉCHAL, E., et al. (1997a). Notch3 Mutations in Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy (CADASIL), a Mendelian Condition Causing Stroke and Vascular Dementia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 826, 213–217.
- Joutel, A., Vahedi, K., and Corpechot, C. (1997b). Strong clustering and stereotyped nature of Notch3 mutations in CADASIL patients. *Lancet* 350, 1511–1515.
- Joutel, A., Andreux, F., Gaulis, S., Domenga, V., Cecillon, M., Battail, N., Piga, N., Chapon, F., Godfrain, C., and Tournier-Lasserre, E. (2000). The ectodomain of the Notch3 receptor accumulates within the cerebrovasculature of CADASIL patients. *J. Clin. Invest.* 105, 597–605.
- Joutel, A., Favrole, P., Labauge, P., and Chabriat, H. (2001). Skin biopsy immunostaining with a Notch3 monoclonal antibody for CADASIL diagnosis. *Lancet* 358, 2049–2051.
- Kanitakis, J., Thobois, S., Claudy, A., and Broussolle, E. (2002). CADASIL (cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy): a neurovascular disease diagnosed by ultrastructural examination of the skin. *J. Cutan. Pathol.* 29, 498–501.
- Kariyazono, H., Ohno, T., Ihara, K., Igarashi, H., Ishikawa, S., and Hara, T. (2001). Rapid detection of the 22q11.2 deletion with quantitative real-time PCR. *Mol. Cell. Probes* 15, 71–73.
- Karlström, H., Beatus, P., Dannaeus, K., Chapman, G., Lendahl, U., and Lundkvist, J. (2002). A CADASIL-mutated Notch 3 receptor exhibits impaired intracellular trafficking and maturation but normal ligand-induced signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 17119–17124.
- Kilarski, L.L., Rutten-Jacobs, L.C.A., Bevan, S., Baker, R., Hassan, A., Hughes, D.A., Markus, H.S., Young, U., Stroke, L., and Study, D. Prevalence of CADASIL and Fabry Disease in a Cohort of MRI Defined Younger Onset Lacunar Stroke.
- Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., and Salzberg, S.L. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions.
- Konialis, C., Hagnefelt, B., and Kokkali, G. (2007). Pregnancy following preimplantation genetic diagnosis of cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL). *Prenat. Diagnosis* 27, 1079–1083.
- Kumar, P., Henikoff, S., and Ng, P.C. (2009). Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat. Protoc.* 4, 1073–1081.
- de la Peña, P., Bornstein, B., del Hoyo, P., Fernández-Moreno, M.A., Martín, M.A., Campos, Y., Gómez-Escalonilla, C., Molina, J.A., Cabello, A., Arenas, J., et al. (2001). Mitochondrial dysfunction associated with a mutation in the Notch3 gene in a CADASIL family. *Neurology* 57, 1235–1238.
- Lackovic, V., Bajcetic, M., Sternic, N., Kostic, V., Zidverc, J., Pavlovic, A., Lackovic, M., and Kocica, M. (2008). Ultrastructural analysis of small blood vessels in skin biopsies in CADASIL. *Arch. Biol. Sci.* 60, 573–580.

- Laurendeau, I., Bahuau, M., Vodovar, N., Larramendy, C., Olivi, M., Bieche, I., Vidaud, M., and Vidaud, D. (1999). TaqMan PCR-based Gene Dosage Assay for Predictive Testing in Individuals from a Cancer Family with INK4 Locus Haploinsufficiency. *986*, 982–986.
- Lawson, N.D., Scheer, N., Pham, V.N., Kim, C.H., Chitnis, a B., Campos-Ortega, J. a, and Weinstein, B.M. (2001). Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during embryonic vascular development. *Development 128*, 3675–3683.
- Lewandowska, E., Dziewulska, D., Parys, M., and Pasennik, E. (2011). Ultrastructure of granular osmiophilic material deposits (GOM) in arterioles of CADASIL patients. *Folia Neuropathol. 49*, 174–180.
- Li, B., Krishnan, V.G., Mort, M.E., Xin, F., Kamati, K.K., Cooper, D.N., Mooney, S.D., and Radivojac, P. (2009). Automated inference of molecular mechanisms of disease from amino acid substitutions. *Bioinformatics 25*, 2744–2750.
- Liem, M.K., Lesnik Oberstein, S. a J., Vollebregt, M.J., Middelkoop, H. a M., van der Grond, J., and Helderman-van den Enden, A.T.J.M. (2008). Homozygosity for a NOTCH3 mutation in a 65-year-old CADASIL patient with mild symptoms: a family report. *J. Neurol. 255*, 1978–1980.
- Liu, X., Zuo, Y., Sun, W., Zhang, W., Lv, H., Huang, Y., Xiao, J., Yuan, Y., and Wang, Z. (2015). The genetic spectrum and the evaluation of CADASIL screening scale in Chinese patients with NOTCH3 mutations. *J. Neurol. Sci. 354*, 63–69.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-dd Ct} Method. *Elsevier Sci. 408*, 402–408.
- Livak, K.J., Flood, S.J.A., Marmaro, J., Giusti, W., and Deetz, K. (1995). Oligonucleotides with Fluorescent Dyes at System Useful for Detecting PCR Product and Nucleic Acid Hybridization. *PCR Methods Appl. 4*, 357–362.
- Maathuis, M., Colombo, D., Kalisch, M., and Bühlmann, P. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Publ. Gr. 7*, 3133–3164.
- Majer, F., Pelak, O., Kalina, T., Vlaskova, H., Dvorakova, L., Honzik, T., Palecek, T., Kuchynka, P., Masek, M., Zeman, J., et al. (2014). Mosaic tissue distribution of the tandem duplication of LAMP2 exons 4 and 5 demonstrates the limits of Danon disease cellular and molecular diagnostics. *J. Inherit. Metab. Dis. 37*, 117–124.
- Maksemous, N., Smith, R.A., Haupt, L.M., and Griffiths, L.R. (2016). Targeted next generation sequencing identifies novel NOTCH3 gene mutations in CADASIL diagnostics patients. *Hum. Genomics 10*, 38.
- Maksimovic, N., Andjelkovic, A., Rasic, V.M., Stojanovic, V.R., Kotlica, B.K., Brankovic, S., Damnjanovic, T., Jekic, B., Bunjevacki, V., Lukovic, L., et al. (2012). Quantitative Analysis of the Dystrophin Gene by Real-time PCR. *Arch. Biol. Sci 64*, 787–792.
- Malandrini, A., Albani, F., Palmeri, S., Fattapposta, F., Gambelli, S., Berti, G., Bracco, A., Tammara, A., Calzavara, S., Villanova, M., et al. (2002). Asymptomatic cores and paracrystalline mitochondrial inclusions in CADASIL.
- Markus, H.S., Martin, R.J., Simpson, M.A., Dong, Y.B., Ali, N., Crosby, A.H., and Powell, J.F. (2002). Diagnostic strategies in CADASIL. *Neurology 59*, 1134–1138.
- Marras, S.A.E., Tyagi, S., and Kramer, F.R. (2006). Real-time assays with molecular beacons and other fluorescent nucleic acid hybridization probes. *Clin. Chim. Acta 363*, 48–60.
- Mayer, M., Straube, A., and Bruening, R. (1999). Muscle and skin biopsies are a sensitive diagnostic tool in the diagnosis of CADASIL. *J. Neurol. 246*, 526–532.
- Melo, J. V., Kent, N.S., Yan, X.-H., and Goldman, J.M. (1994). Controls for Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction Amplification of BCR-ABL Transcripts [letter]. *Blood 84*, 3984–3986.
- Milunsky, a, Konialis, C., Shim, S.H., Maher, T. a, Spengos, K., Ito, M., and Pangalos, C. (2005). The prenatal diagnosis of cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL) by mutation analysis. *Prenat. Diagn. 25*, 1057–1058.
- Monet, M., Domenga, V., Lemaire, B., Souilhol, C., Langa, F., Babinet, C., Gridley, T., Tournier-Lasserre, E., Cohen-Tannoudji, M., and Joutel, A. (2007). The archetypal R90C CADASIL-NOTCH3 mutation retains NOTCH3 function in vivo. *Hum. Mol. Genet. 16*, 982–992.

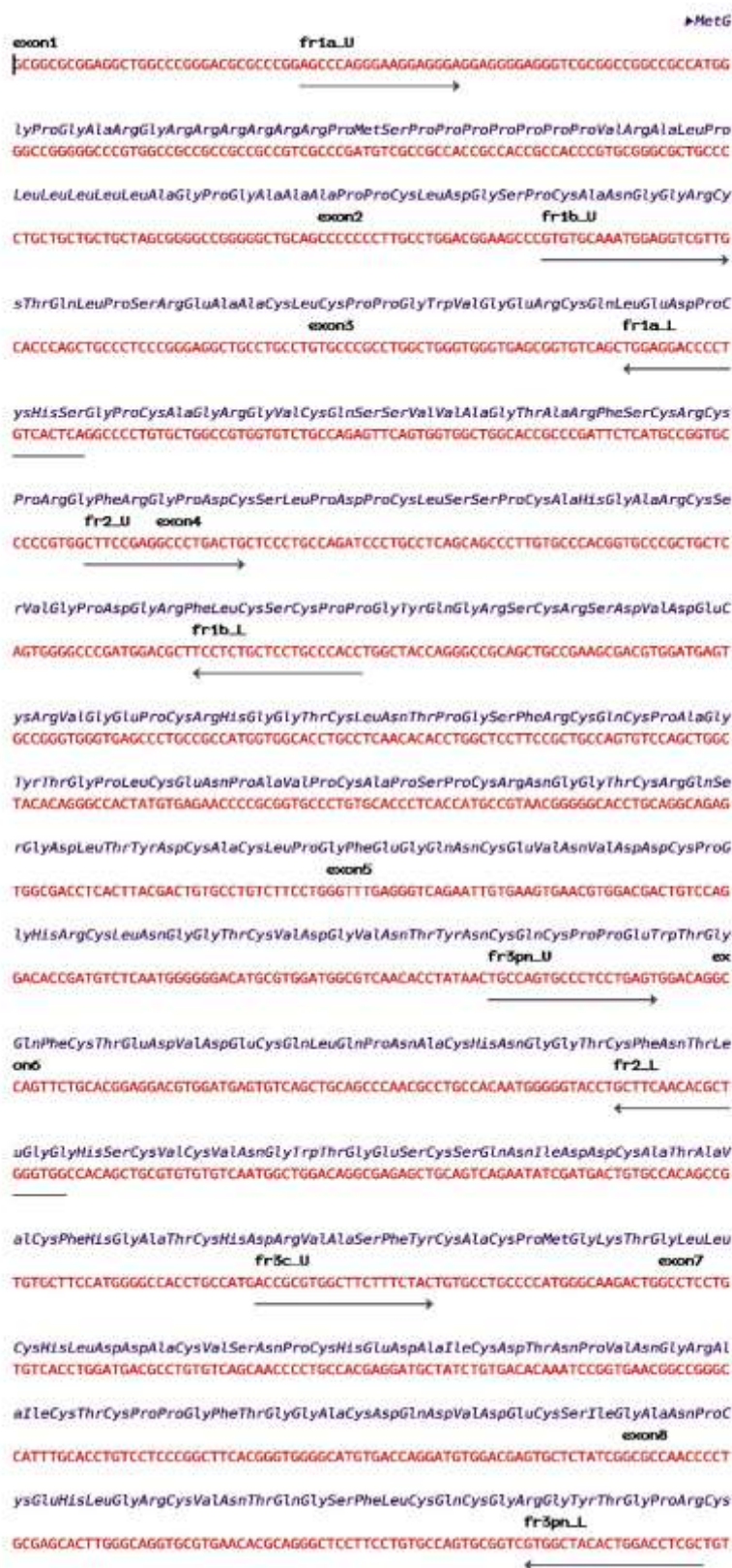
- Monet-Leprêtre, M., Haddad, I., line Baron-Menguy, C., Fouillot-Panchal, M., Riani, M., rie Domenga-Denier, V., Dussaule, C., Cognat, E., Vinh, J., Joutel, A., et al. (2013). Abnormal recruitment of extracellular matrix proteins by excess Notch3 ECD : a new pathomechanism in CADASIL. *Brain* 136, 1830–1845.
- Moore, D., and Dowhan, D. (2002). Manipulation of Dna. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2.1, 1–10.
- Moreton, F.C., Razvi, S.S.M., Davidson, R., and Muir, K.W. (2014). Changing clinical patterns and increasing prevalence in CADASIL. *Acta Neurol. Scand.* 130, 197–203.
- Mykkänen, K., Junna, M., and Amberla, K. (2009). Different clinical phenotypes in monozygotic CADASIL twins with a novel NOTCH3 mutation. *Stroke* 40, 2215–2218.
- Nye, J.S., Kopan, R., and Axel, R. (1994). An activated Notch suppresses neurogenesis and myogenesis but not gliogenesis in mammalian cells. *Development* 120, 2421–2430.
- Opherk, C., Peters, N., Herzog, J., Luedtke, R., and Dichgans, M. (2004). Long-term prognosis and causes of death in CADASIL: a retrospective study in 411 patients. *Brain* 127, 2533–2539.
- Opherk, C., Duering, M., Peters, N., Karpinska, A., Rosner, S., Schneider, E., Bader, B., Giese, A., and Dichgans, M. (2009). CADASIL mutations enhance spontaneous multimerization of NOTCH3. *Hum. Mol. Genet.* 18, 2761–2767.
- Pescini, F., Bianchi, S., Salvadori, E., Poggesi, A., Dotti, M.T., Federico, A., Inzitari, D., and Pantoni, L. (2008). A pathogenic mutation on exon 21 of the NOTCH3 gene causing CADASIL in an octogenarian paucisymptomatic patient. *J. Neurol. Sci.* 267, 170–173.
- Pescini, F., Nannucci, S., Bertaccini, B., Salvadori, E., Bianchi, S., Ragno, M., Sarti, C., Valenti, R., Zicari, E., Moretti, M., et al. (2012). The Cerebral Autosomal-Dominant Arteriopathy With Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy (CADASIL) Scale: a screening tool to select patients for NOTCH3 gene analysis. *Stroke* 43, 2871–2876.
- Peters, N., and Opherk, C. (2005). Spectrum of Mutations in Biopsy-Proven CADASIL. *Arch. Neurol.* 62, 1091–1094.
- Peters, N., Herzog, J., Opherk, C., and Dichgans, M. (2004a). A two-year clinical follow-up study in 80 CADASIL subjects: progression patterns and implications for clinical trials. *Stroke* 35, 1603–1608.
- Peters, N., Opherk, C., and Zacherle, S. (2004b). CADASIL-associated Notch3 mutations have differential effects both on ligand binding and ligand-induced Notch3 receptor signaling through RBP-Jk. *Exp. Cell Res.* 299, 454–464.
- Pradotto, L., Orsi, L., Daniele, D., Caroppo, P., Lauro, D., Milesi, A., Sellitti, L., and Mauro, A. (2012). A new NOTCH3 mutation presenting as primary intracerebral haemorrhage. *J. Neurol. Sci.* 315, 143–145.
- Prakash, N., Hansson, E., Betsholtz, C., Mitsiadis, T., and Lendahl, U. (2002). Mouse Notch 3 Expression in the Pre- and Postnatal Brain: Relationship to the Stroke and Dementia Syndrome CADASIL. *Exp. Cell Res.* 278, 31–44.
- Ragno, M., Pianese, L., Pinelli, M., and Silvestri, S. (2011). Shorter telomeres in patients with cerebral autosomal dominant arteriopathy and leukoencephalopathy (CADASIL). *Neurogenetics* 337–343.
- Razvi, S.S.M. (2005). The prevalence of cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL) in the west of Scotland. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 76, 739–741.
- Reese, M.G., Eeckman, F.H., Kulp, D., and Haussler, D. (1997). Improved Splice Site Detection in Genie. *J Comp Biol* 4, 311–323.
- Rinnoci, V., Nannucci, S., Valenti, R., Donnini, I., Bianchi, S., Pescini, F., Dotti, M.T., Federico, A., Inzitari, D., and Pantoni, L. (2013). Cerebral hemorrhages in CADASIL: Report of four cases and a brief review. *J. Neurol. Sci.* 330, 45–51.
- Ruchoux, M.M., Chabriat, H., Bousser, M.G., Baudrimont, M., and Tournier-Lasserre, E. (1994). Presence of ultrastructural arterial lesions in muscle and skin vessels of patients with CADASIL. *Stroke* 25, 2291–2292.
- Rusanescu, G., and Mao, J. (2014). Notch3 is necessary for neuronal differentiation and maturation in the adult spinal cord. *J. Cell. Mol. Med.* 18, 2103–2116.

- Rutten, J.W., Boon, E.M.J., Liem, M.K., Dauwerse, J.G., Pont, M.J., Vollebregt, E., Maat-Kievit, A.J., Ginjaar, H.B., Lakeman, P., van Duinen, S.G., et al. (2013). Hypomorphic NOTCH3 alleles do not cause CADASIL in humans. *Hum. Mutat.* *34*, 1486–1489.
- Rutten, J.W., Dauwerse, H.G., Peters, D.J.M., Goldfarb, A., Venselaar, H., Haffner, C., Van Ommen, G.J.B., Aartsma-Rus, A.M., and Lesnik Oberstein, S.A.J. (2016a). Therapeutic NOTCH3 cysteine correction in CADASIL using exon skipping: In vitro proof of concept. *Brain* *139*, 1123–1135.
- Rutten, J.W., Dauwerse, H.G., Gravesteyn, G., van Belzen, M.J., van der Grond, J., Polke, J.M., Bernal-Quiros, M., and Lesnik Oberstein, S.A.J. (2016b). Archetypal NOTCH3 mutations frequent in public exome: implications for CADASIL. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* *3*, 844–853.
- Schaeffeler, E., Schwab, M., Eichelbaum, M., and Zanger, U.M. (2003). CYP2D6 Genotyping Strategy Based on Gene Copy Number Determination by TaqMan Real-Time PCR. *Hum. Mutat.* *485*, 476–485.
- Schmidt, H., Zeginigg, M., Wiltgen, M., Freudenberger, P., Petrovic, K., Cavalieri, M., Gider, P., Enzinger, C., Fornage, M., Debette, S., et al. (2011). Genetic variants of the NOTCH3 gene in the elderly and magnetic resonance imaging correlates of age-related cerebral small vessel disease. *Brain* *134*, 3384–3397.
- Schmittgen, T.D., Zakrajsek, B.A., Mills, A.G., Gorn, V., Singer, M.J., and Reed, M.W. (2000). Quantitative Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction to Study mRNA Decay : Comparison of Endpoint and Real-Time Methods 1. *204*, 194–204.
- Schouten, J.P., McElgunn, C.J., Waaijer, R., Zwiijnenburg, D., Diepvens, F., and Pals, G. (2002). Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* *30*, e57.
- Schröder, J.M., Züchner, S., Dichgans, M., Nagy, Z., and Molnar, M.J. (2005). Peripheral nerve and skeletal muscle involvement in CADASIL. *Acta Neuropathol.* *110*, 587–599.
- Schwarz, J.M., Cooper, D.N., Schuelke, M., and Seelow, D. (2014). MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat. Methods* *11*, 361–362.
- Serafin, V., Persano, L., Moserle, L., Esposito, G., Ghisi, M., Curtarello, M., Bonanno, L., Masiero, M., Ribatti, D., Stürzl, M., et al. (2011). Notch3 signalling promotes tumour growth in colorectal cancer. *J. Pathol.* *224*, 448–460.
- Singhal, S., Bevan, S., Barrick, T., Rich, P., and Markus, H.S. (2004). The influence of genetic and cardiovascular risk factors on the CADASIL phenotype. *Brain* *127*, 2031–2038.
- Soong, B.-W., Liao, Y.-C., Tu, P.-H., Tsai, P.-C., Lee, I.-H., Chung, C.-P., and Lee, Y.-C. (2013). A homozygous NOTCH3 mutation p.R544C and a heterozygous TREX1 variant p.C99MfsX3 in a family with hereditary small vessel disease of the brain. *J. Chin. Med. Assoc.* *76*, 319–324.
- Stothard, P. (2000). The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques* *28*, 1102,1104.
- Tan, R.Y.Y., and Markus, H.S. (2016). CADASIL: Migraine, encephalopathy, stroke and their inter-relationships. *PLoS One* *11*, 1–14.
- Thornton, B., and Basu, C. (2011). Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* *39*, 145–154.
- Tikka, S., Mykkanen, K., and Ruchoux, M. (2009). Congruence between NOTCH3 mutations and GOM in 131 CADASIL patients. *Brain* *132*, 933–939.
- Tournier-Lasserre, E. (1993). Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy maps to chromosome 19q12. *Nat. Genet.* *3*, 256–259.
- Tournier-Lasserre, E., Joutel, A., Melki, J., Weissenbach, J., Lathrop, G.M., Chabriat, H., Mas, J.L., Cabanis, E.A., Baudrimont, M., and Maciazek, J. (1993). Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy maps to chromosome 19q12.
- Tuominen, S., Juvonen, V., Amberla, K., Jolma, T., Rinne, J.O., Tuisku, S., Kurki, T., Marttila, R., Poyhonen, M., Savontaus, M.-L., et al. (2001). Phenotype of a Homozygous CADASIL Patient in Comparison to 9 Age-Matched Heterozygous Patients With the Same R133C Notch3 Mutation. *Stroke* *32*, 1767–1774.

- Tyagi, S., and Kramer, F.R. (1996). Molecular Beacons: Probes that Fluoresce upon Hybridization. *Nat. Biotechnol.* *14*, 303–308.
- Uyguner, Z.O., Siva, A., Kayserili, H., Saip, S., and Alt, A.N. (2006). The R110C mutation in Notch3 causes variable clinical features in two Turkish families with CADASIL syndrome. *246*, 123–130.
- Valenti, R., Bianchi, S., Pescini, F., D'Eramo, C., Inzitari, D., Dotti, M.T., and Pantoni, L. (2011). First report of a pathogenic mutation on exon 24 of the NOTCH3 gene in a CADASIL family. *J. Neurol.* *258*, 1632–1636.
- Vaughn, C.P., Lyon, E., and Samowitz, W.S. (2008). Confirmation of Single Exon Deletions in MLH1 and MSH2 Using Quantitative Polymerase Chain Reaction. *J. Mol. Diagnostics* *10*, 355–360.
- Viitanen, M., Sundström, E., Baumann, M., Poyhonen, M., Tikka, S., and Behbahani, H. (2013). Experimental studies of mitochondrial function in CADASIL vascular smooth muscle cells. *Exp. Cell Res.* *319*, 134–143.
- Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1999). Digital PCR. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *96*, 9236–9241.
- Wang, Y., Pan, L., Moens, C.B., and Appel, B. (2014). Notch3 establishes brain vascular integrity by regulating pericyte number. *Development* *141*, 307–317.
- Weiming, F., Yuliang, W., Youjie, L., Xinsheng, L., Shuyang, X., and Zhaoxia, L. (2013). A novel Notch3 deletion mutation in a Chinese patient with cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leucoencephalopathy (CADASIL). *J. Clin. Neurosci.* *20*, 322–323.
- Weinmaster, G., Roberts, V.J., and Lemke, G. (1991). A homolog of Drosophila Notch expressed during mammalian development. *Development* *113*, 199–205.
- Whitcombe, D., Theaker, J., Guy, S.P., Brown, T., and Little, S. (1999). Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nat. Biotechnol.* *17*, 804–807.
- Wilder-Smith, E., Shen, Y., Ng, Y.K., Yu, G.X., Chew, N.K., Tan, C.T., and Wong, M.C. (2004). Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leucoencephalopathy (CADASIL) in a Chinese family: clinical, radiological and skin biopsy features. *J. Clin. Neurosci.* *11*, 304–307.
- Wollenweber, F.A., Hanecker, P., Bayer-Karpinska, A., Malik, R., Bänzner, H., Moreton, F., Muir, K.W., Müller, S., Giese, A., Opherck, C., et al. (2015). Cysteine-sparing CADASIL mutations in NOTCH3 show proaggregatory properties in vitro. *Stroke* *46*, 786–792.
- Xinzhen Yin, Dingwen Wu, Jinping Wan, Shenqiang Yan, Min Lou, Guohua Zhao, and Baorong Zhang (2015). Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leucoencephalopathy: Phenotypic and mutational spectrum in patients from mainland China. *Int. J. Neurosci.* *125*, 582–592.
- Yamaguchi, N., Oyama, T., Ito, E., Satoh, H., Azuma, S., Hayashi, M., Shimizu, K., Honma, R., Yanagisawa, Y., Nishikawa, A., et al. (2008). NOTCH3 Signaling Pathway Plays Crucial Roles in the Proliferation of ErbB2-Negative Human Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* *68*.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., and Madden, T.L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* *13*.
- Yuan, X., and Dong, Z. (2016). The Association Between the Genetic Variants of the NOTCH3 Gene and Ischemic Stroke Risk. *Med. Sci. Monit.* *22*, 3910–3914.
- Zaucker, A., Mercurio, S., Sternheim, N., Talbot, W.S., and Marlow, F.L. (2013). Notch3 Is Essential for Oligodendrocyte Development and Vascular Integrity in Zebrafish. *Dis. Model. Mech.* *6*, 1246–1259.
- Zhu, C.-Y., Wang, Y., Zeng, Q.-X., Qian, Y., Li, H., Yang, Z.-X., Yang, Y.-M., Zhang, Q., Li, F.-F., and Liu, S.-L. (2016). Combined effects of age and polymorphisms in Notch3 in the pathogenesis of cerebral infarction disease. *Metab. Brain Dis.* *31*, 1157–1164.

PŘÍLOHA 1

Příloha 1: Grafické znázornění nasedacích míst primerů použitých pro analýzu transkriptu na sekvenci cDNA genu *NOTCH3*



PŘÍLOHA 1

[illegible]

PŘÍLOHA 1

roArgCysAlaArgAspValAspGluCysLeuSerAsnProCysGlyProGlyThrCysThrAspHisValAlaSerPhe
fr8_U
CACGATGCGCCCGATGTGGATGAGTGCTGAGCAACCCCTGCGGCCCGGACCTGTACCGACACGTGGCTCTCTTC

ThrCysThrCysProProGlyTyrGlyGlyPheHisCysGluGlnAspLeuProAspCysSerProSerSerCysPheAs
exon18
ACCTGCACCTGCCCGCAGGCTACGGAGGCTTCCACTGCGAACAGGACCTGCCGACTGCAGCCCCAGCTCTGCTTCAA
→

nGlyGlyThrCysValAspGlyValAsnSerPheSerCysLeuCysArgProGlyTyrThrGlyAlaHisCysGlnHisG
fr7n_L
TGGCGGACCTGTGTGGACGGGTGAACCTGTTCACTGCTGTGCCGTCCCGCTACACAGGAGCCCACTGCCAACATG
←

luAlaAspProCysLeuSerArgProCysLeuHisGlyGlyValCysSerAlaAlaHisProGlyPheArgCysThrCys
AGGCAGACCCCTGCTCTCGCGGCCCTGECTACACGGGGCTCTGAGCGCCGCCACCTGGCTTCCGCTGCACCTGC
LeuGluSerPheThrGlyProGlnCysGlnThrLeuValAspTrpCysSerArgGlnProCysGlnAsnGlyGlyArgCy
exon19
CTCGAGAGCTTACAGGGCCCGAGTGCCAGACGCTGGTGGATTGGTGACCCGCCACCTTGTCAAAACGGGGTCGCTG

sValGlnThrGlyAlaTyrCysLeuCysProProGlyTrpSerGlyArgLeuCysAspIleArgSerLeuProCysArgG
CGTCCAGACTGGGGCTATTGCTTTGTCCCTCTGGATGAGCGGACGCTCTGTGACATCCGAAGCTTCCCTGCAGGG
luAlaAlaAlaGlnIleGlyValArgLeuGluGlnLeuCysGlnAlaGlyGlyGlnCysValAspGluAspSerSerHis
exon20
AGGCCGAGCCAGATCGGGTGCAGTGGAGCAGCTGTCTCAGCGGGTGGCAGTGTGTGGATGAAGACAGCTCCAC

TyrCysValCysProGluGlyArgThrGlySerHisCysGluGlnGluValAspProCysLeuAlaGlnProCysGlnHi
fr9_U
TACTGCTGTGCCAGAGGGCCGTACTGGTAGCCACTGTGAGCAGGAGTGGACCCCTGCTTGGCCAGCCCTGCCAGCA
→

sGlyGlyThrCysArgGlyTyrMetGlyGlyTyrMetCysGluCysLeuProGlyTyrAsnGlyAspAsnCysGluAspA
exon21
TGGGGGACCTGCGTGCTATATGGGGGCTACATGTGTGAGTGTCTTCTGCTACAATGTGTATACTGTGAGGACG

spValAspGluCysAlaSerGlnProCysGlnHisGlyGlySerCysIleAspLeuValAlaArgTyrLeuCysSerCys
fr8_L
ACGTGGACGAGTGTGCTCCAGCCCTGCCAGACGGGGTTTCATGCACTTGACTCGTGCCCGCTATCTGTCTCTGT
←

ProProGlyThrLeuGlyValLeuCysGluIleAsnGluAspAspCysGlyProGlyProProLeuAspSerGlyProAr
exon22
CCCCAGGAACGCTGGGGGTGCTCTCGGAGATTAAATGAGGATGACTGCGGCCAGGCCACCGCTGGACTCAGGGCCCCG

gCysLeuHisAsnGlyThrCysValAspLeuValGlyGlyPheArgCysThrCysProProGlyTyrThrGlyLeuArgC
GTGCTACACAATGGCAGCTGCTGAGGACCTGGTGGGTGTTCCGCTGCACCTGTCCCCAGGATACACTGTTTGGCT

ysGluAlaAspIleAsnGluCysArgSerGlyAlaCysHisAlaAlaHisThrArgAspCysLeuGlnAspProGlyGly
GCGAGGACAGACATCAATGAGTGTGCTCAGGTGCTGACACGCGCACACACCCGGACTGCTGAGGACCCAGGCGGA
GlyPheArgCysLeuCysHisAlaGlyPheSerGlyProArgCysGlnThrValLeuSerProCysGluSerGlnProCy
exon23
GGTTTCGTTGCTTTGTGATGCTGGCTTCTCAGGTCTCGCTGTCAGACTGTCTGTCTCCCTGGGAGTCCAGCCATG

sGlnHisGlyGlyGlnCysArgProSerProGlyProGlyGlyGlyLeuThrPheThrCysHisCysAlaGlnProPheT
exon24
CCAGCATGGAAGCCAGTGCCGTCTAGCCCGGTECTGGGGTGGGCTGACCTTCACTGTCACTGTGCCAGCCGTTCT

rpGlyProArgCysGluArgValAlaArgSerCysArgGluLeuGlnCysProValGlyValProCysGlnGlnThrPro
GGGTCTCGCTTGGAGCGGGTGGCGCTCTGCGGGAGCTGAGTGCCCGTGGGCTCCCATGCCAGCAGACGCC
ArgGlyProArgCysAlaCysProProGlyLeuSerGlyProSerCysArgSerPheProGlySerProProGlyAlaSe
fr9_L
CGCGGECGCGCTGCGCTGCCCTGCCCTGAGGTTGTCGGGACCTCTGCGCGAGCTTCCGGGTGCGCCGCGGGGCCAG
←

rAsnAlaSerCysAlaAlaAlaProCysLeuHisGlyGlySerCysArgProAlaProLeuAlaProPhePheArgCysA
CAACGCCAGCTGCGCGGCCGCCCTGTCTCCAGGGGGCTCTGCGGCCCGCGCGCTGCGGCTTCTTCTCGCTGCG
laCysAlaGlnGlyTrpThrGlyProArgCysGluAlaProAlaAlaAlaProGluValSerGluGluProArgCysPro
CTTGCGCGCAGGCTGGACCGGGCCGCTGCGAGGCGCCGCGCGGACCCGAGGTCTCGAGGAGCGCGGTGCCCG

ArgAlaAlaCysGlnAlaCysArgGlyAspGlnArgCysAspArgGluCysAsnSerProGlyCysGlyTrpAspGlyGly
CGCGCCGCTGCCAGGCCAAGCGGGGACCAAGCGCTGCGACCGGAGTGCAACAGCCAGGCTGCGGCTGGAGCGGCG
yAspCysSerLeuSerValGlyAspProTrpArgGlnCysGluAlaLeuGlnCysTrpArgLeuPheAsnSerArgC
CGAGTGTCTGCTGAGCGTGGCGGACCTTGGCGGCAATGCGAGGCGCTGAGTGTGCGGCTTCTTCAACACAGCGCT

